Aus dem Zentralinstitut für Anaesthesiologie
und Transfusionswesen der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer

INTRAVASALER ABBAU VON HYDROXYÄTHYLSTÄRKE (HÄS), VERÄNDERUNGEN DER HÄS-KONZENTRATIONEN UND DER HÄS-MOLEKULAR-GEWICHTSVERTEILUNGEN IM SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

CHRISTOPH EHRENSPERGER
aus Spaichingen

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536524_0014

Aus dem Zentralinstitut für Anaesthesiologie
und Transfusionswesen der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer

INTRAVASALER ABBAU VON HYDROXYÄTHYLSTÄRKE (HÄS), VERÄNDERUNGEN DER HÄS-KONZENTRATIONEN UND DER HÄS-MOLEKULAR-GEWICHTSVERTEILUNGEN IM SERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

CHRISTOPH EHRENSPERGER
aus Spaichingen

1984

Dekan: Professor Dr. H.D. Waller
1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Hempel
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Heller

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung 4

2. Versuchspersonen, Material und Methoden 6
2.1. Versuchspersonen und Untersuchungsmaterial 6
2.2. Analytische Methoden 7
2.2.1. HÄS-Bestimmung 7
2.2.2. Gelchromatographie 9
2.3. Statistische Methoden 10
2.4. Fehlerbetrachtung 10
2.4.1. Spezifität und Richtigkeit 10
2.4.2. Präzision 11

3. Ergebnisse 13
3.1. Serum HÄS-Konzentrationen 13
3.1.1. HÄS ($\bar{M}w$ 450.000 / MS 0,7) im Serum 13
3.1.2. HÄS ($\bar{M}w$ 40.000 / MS 0,5) im Serum 14
3.2. Gelchromatographien von HÄS 16
3.2.1. Molekulargewichtsverteilung von HÄS ($\bar{M}w$ 450.000 / MS 0,7) vor Infusion 16
3.2.2. Molekulargewichtsverteilung von HÄS ($\bar{M}w$ 450.000 / MS 0,7) nach Infusion 17

4. Zur Theorie des enzymatischen HÄS-Abbaus 21
4.1. Daten und Fakten zu Amylopektin, HÄS und ihrer Hydrolyse durch α-Amylase 22
4.1.1. Struktur des Amylopektins 22
4.1.2. Enzymatischer Abbau von Amylopektin durch α-Amylase 23
4.1.3. Enzymatischer Abbau von HÄS durch α-Amylase 25
4.1.4. Das idealtypische HÄS-Molekül 27
4.2. Überlegungen aus Kombinatorik und Wahrscheinlichkeitstheorie 28
4.2.1. Das mathematische Instrumentarium 28
4.2.2. Angewandte Mathematik 33
4.2.3. Einflüsse auf die theoretische Hydrolysewahrscheinlichkeit von HÄS 37

5. Diskussion 40
5.1. Nachweisverfahren 40
5.2. Experimentelle Ergebnisse 42
5.3. Vergleich von Experiment und Theorie 44
6. Zusammenfassung 47
7. Literatur 49
Danksagung 58
Lebenslauf 59

Einleitung

Mit zunehmender Erkenntnis der pathophysiologischen Bedeutung des intravasalen Volumenmangels beim Entstehen von Schockzuständen ist das Bedürfnis nach einfach herzustellenden und möglichst problemlos zu verwendenden Plasmaexpandern gewachsen.
Neben Dextranen hat sich dabei Hydroxyäthylstärke (HÄS) als eine Substanz mit besonders günstigen chemischen und physiologischen Eigenschaften erwiesen (1, 13, 15, 17, 18, 20, 27, 30, 44); HÄS verfügt zudem über die geringste allergische Nebenwirkungsrate aller Plasmaexpander (30).

HÄS ist ein Derivat der Sorghumstärke, die wiederum nahezu vollständig aus Amylopektin besteht. Das schlecht wasserlösliche und rasch enzymatisch abbaufähige Amylopektin hat eine baumartige, globuläre Struktur. Durch Hydroxyäthylierung gewinnt man schließlich HÄS, eine Substanz, die hydrophil ist und deren enzymatische Spaltung durch die Hydroxyäthylgruppen gehemmt wird (31, 43, 61). Durch Variationen des mittleren Molekulargewichts $\overline{M}w$ und/oder des molaren Substitutionsgrades MS entsteht eine ganze HÄS-Familie, deren Mitglieder über unterschiedliche pharmakokinetische und physiologische Eigenschaften verfügen (34 - 39, 43, 52 - 57) und so verschiedenen Einsatzbedingungen angepaßt werden können.

Legt man die vom American National Research Council definierten Anforderungen an einen Volumenexpander zugrunde (Zit. nach (59)):

1. Die Intravasale Halbwertszeit soll mindestens 6 h betragen.
2. Die Kolloidmoleküle sollen metabolisiert und letztlich aus dem Körper ausgeschieden werden.
3. Auch bei wiederholter Anwendung darf keine Einschränkung der Organfunktion erfolgen.

so ist das erste Kriterium für HÄS durch entsprechende Wahl von $\bar{M}w$ und MS zu erfüllen; inwieweit die Vorgaben zwei und drei eingehalten werden, ist weniger klar (6, 33 - 37, 53, 57). HÄS-Moleküle werden durch α -Amylase gespalten, dabei entstehen Spaltprodukte niedermolekularer HÄS (21, 38 - 41, 44, 52, 53), und es werden Glucose und Maltose frei (48), ein großer Anteil davon wird über die Niere ausgeschieden (35, 41, 44, 54, 59). Reste verbleiben über längere Zeit im Gefäßsystem (19, 29, 37), und ein Teil wird ins RES aufgenommen (18, 29, 54), wobei das genaue Schicksal auf diesem Weg noch nicht schlüssig belegt ist. Organbeeinträchtigungen, wie sie nach Übertransfusionen vermutet wurden (29), sind unter physiologischen Dosen nicht nachzuweisen (7, 19, 37, 56, 57).
Die Qualität der Argumente in dieser noch offenen Diskussion ist abhängig von der Anzahl der Messungen und der Beobachtungsdauer bei pharmakologischen Untersuchungen, weiterhin von der Spezifität und Präzision der verwendeten Nachweisverfahren für HÄS und letztlich von der Einbeziehung struktureller Kenntnisse über den enzymatischen Abbau von Amylopektin- und HÄS-Molekülen in die Interpretation der Meßergebnisse.

Diese Arbeit will besonders im Hinblick auf die beiden zuletzt genannten Punkte einen Beitrag leisten. Zur Anwendung kommt ein halbautomatisches Bestimmungsverfahren zur Messung von Kohlenhydratkonzentrationen im Serum und im Filtrat gelchromatographischer Auftrennungen der HÄS. Die Methode ist überaus sensibel und störunanfällig.
Aus einer Synopse der bisherigen Erkenntnisse über die Einwirkung von α-Amylase auf Amylopektin und HÄS wird ein idealtypisches HÄS-Modell erstellt. Daran ausgeführte Beispielrechnungen anhand kombinatorischer Überlegungen geben Erwartungswerte für eine enzymatische Spaltung ab, die mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden.

2. Versuchspersonen, Material und Methoden

2.1. Versuchspersonen und Untersuchungsmaterial

An dieser Untersuchung haben 28 Personen, aufgegliedert in drei Gruppen, teilgenommen. Gruppe I bestand aus zehn freiwilligen Männern, die pro kg Körpergewicht 10 ml hochmolekulare HÄS 6% ($\bar{M}w$ 450.000, MS 0,7; Plasmasteril^{R}, Dr. Fresenius KG Bad Homburg) erhielten.
Gruppe II setzte sich aus 10 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Tübingen zusammen. Sie erhielten je 500 ml derselben hochmolekularen HÄS 6% wie die Gruppe I infundiert.
Schließlich wurden in Gruppe III acht Patientinnen/en der Orthop. Universitätsklinik Tübingen beobachtet, die je 500 ml Infusionslösung niedermolekularer HÄS 6% ($\bar{M}w$ 40.000, MS 0,5 - 0,55; Expafusin^{R}, Fa. J. Pfrimmer, Erlangen) zugeführt bekamen.
Bei den Versuchspersonen der Gruppen II und III waren die Infusionen indiziert im Rahmen eines operativen Eingriffs, bei den hier berücksichtigten Patienten war der Blutverlust laut Anästhesieprotokoll stets kleiner 250 ml.

Die HÄS-Lösungen wurden über eine flexible Verweilkanüle innerhalb von 60 $\pm$ 6 Min. in eine Unterarmvene infundiert. Die Blutentnahmen erfolgten am anderen Arm, jeweils unmittelbar vor und nach den Infusionen, sowie in

Gruppe I : 2h, 5h, 168h
Gruppe II : 2h, 6h, 24h, 120h nach Infusionsende
Gruppe III: 2h, 6h, 24h, 72h, 168h

Das Serum der Blutproben wurde mit 3.500 U/Min. abzentrifugiert, auf unter - 18^{o}C tiefgekühlt und so bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Bestimmung der HÄS-Serumkonzentrationen

Mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden ist eine direkte Bestimmung von HÄS in Blut und Gewebe nicht entwickelt worden, man ist somit auf indirekte Verfahren angewiesen. Hier wird als HÄS-Serumkonzentration die Differenz aus der Gesamtkohlenhydratkonzentration (Kh) abzüglich des aktuellen Glucosewerts und der weder HÄS noch Glucose zuzuordnenden Kohlenhydrate im Serum vor den Infusionen betrachtet. Dies heißt für die einzelne Probe:

$$HÄS_{aj} = (Kh - Gluc)_{aj} - (Kh - Gluc)_{a.o.}$$

a = Nr. d. Versuchsperson
a.o. = vor Infusion
j = Probennr. nach Infusion

Die Serumglucosekonzentrationen wurden enzymatisch mit der Glucose-Hexokinase-Methode festgestellt (47).

Die Gesamtkohlenhydratkonzentration wird hier mit der Orcin-Schwefelsäure-Methode ermittelt (4). Dabei werden vorbereitend, um eine Verschmutzung des Geräts zu vermeiden, die Serumproben mit 0,33N Perchlorsäure enteiweißt und danach im abzentrifugierten Überstand die Gesamtkh.-Konz. mit einem Biotronik-Zuckeranalysator ZA 5.100 gemessen. Das Gerät wurde in dieser Form von H. Bauer entwickelt (4).
Die Arbeitsweise des Analysators sei kurz dargestellt: Über ein Ventil wird eine Probe drucklos aufgegeben und dann mit dem Orcin-Reagenz (0,1% Orcin in konz. Schwefelsäure) gemischt. Während eines 3 minütigen Durchlaufs einer 10 m langen Reaktionscoil, bei 100°C, werden sämtliche Kohlenhydrate hydrolysiert. Dabei entsteht aus den Glucoseresten ein Hydroxymethyl-

furfural, das wiederum mit Orcin reagiert und eine Färbung bewirkt. Die Extinktion dieses Farbstoffes wird bei 420 nm über ein Filterphotometer (Biotronik LC 6.620) kontinuierlich gemessen und über einen Schreiber graphisch festgehalten. Ein Schema des Analysators zeigt Abb. 2.1. Die erste Näherung des Kurvenintegrals (Peakhöhe x Peakbreite in halber Höhe) wird hier als Maß für die der Extinktion zugrunde liegende Kohlenhydratmenge angesehen. Als Eichstandards dienten verschiedene Mengen von Verdünnungsansätzen der beiden HÄS-Lösungen aus denselben Herstellungsserien, die bei den Probanden verwendet wurden. In den interessierenden Meßbereichen wurden Konzentrationsverhältnisse von 1 : 125 mit hoher Linearität wiedergegeben. Die Nachweisgrenze der Apparatur lag bei 0,1 ug HÄS absolut.

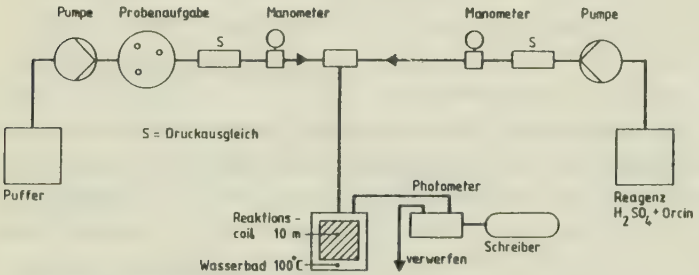


Abb. 2.1. Zuckeranalysator

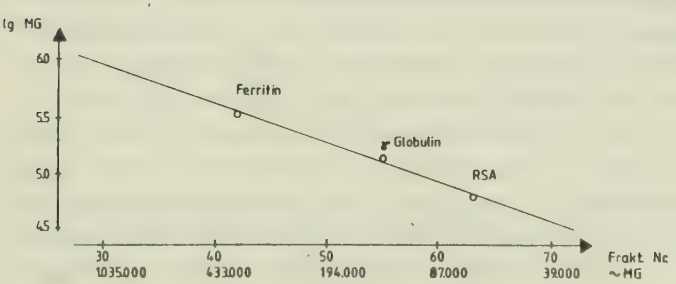


Abb. 2.2. Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung

2.2.2. Gelchromatographie

Die verwendeten HÄS-Lösungen sind Mischungen von Stärkemolekülen unterschiedlichen Molekulargewichts. Um Aufschluß über die Veränderungen der Molekulargewichtsverteilungen im Serum zu bekommen, wurden Gelchromatographien von enteiweißten Serumproben durchgeführt, sowie zuvor die Vergleichsverteilung der Original-HÄS-Lösung chromatographisch dargestellt. Die Auftrennung der HÄS 450.000 erfolgte an einer Säule, die mit einem Agarose Gel (Biogel A 1,5 m) für den Arbeitsbereich 10^4 - 1,5 x 10^6 Dalton gepackt war. (Säulenabmessung: Länge 1 m, Durchmesser 0,74 cm). Jeweils 1 ml der HÄS-Lösung bzw. der enteiweißten Probe wurden auf die Säule gegeben und mit einem Puffer von 100 mMol NaCl in Aqua dest. in einer Geschwindigkeit von 3,6 ml/h eluiert. Insgesamt wurden pro Durchlauf 80 Fraktionen à 1 ml aufgefangen und darin die HÄS- bzw. Kohlenhydratkonzentration bestimmt. Die Eichung der Säule geschah mit einem Proteingemisch aus Ferritin (MG 346.000), Gamma-Globulin IgG (MG 150.000) und Rinder-Serum-Albumin (MG 68.000), das über dieselbe Säule eluiert wurde. Dieser Weg war notwendig, weil großmolekulare Kohlenhydratgemische mit definierten Molekulargewichten nicht zur Verfügung stehen. Dennoch kann eine hinreichende Genauigkeit der Eichung angenommen werden, da HÄS ebenfalls eine globuläre Struktur aufweist (16,28). Das Ergebnis der Eichung zeigt Abb. 2.2. Die Regressionsgerade der Eichpunkte genügt der Gleichung:

$$\lg MG = - 0{,}034906 \times V_{el} + 7{,}0325$$

2.3. Auswertung und statistische Überprüfung

Alle Proben zur Bestimmung der HÄS-Serum-Konzentration wurden doppelt angesetzt und bestimmt, stichprobenweise vierfach. Die Meßergebnisse konnten dabei mit einer Streuung von $< 2\%$ reproduziert werden (sh. 2.4.). Bei dieser geringen Streuung erscheint die Mittelwertbildung aus 2 bzw. 4 Werten wenig sinnvoll. Es wurden deshalb die Proben einer Versuchsperson in einem Arbeitsgang aufbereitet und in einer Meßserie ausgewertet. Die Werte jeweils einer der beiden Meßserien eines Probanden wurden in die Auswertung einbezogen.
Für die Gelfiltration von HÄS im Serum wurde je ein repräsentanter Proband aus Gruppe I und II ausgewählt. Die individuellen Meßwerte dieser Personen kamen den mittleren HÄS-Serum-Konzentrations-Verläufen ihrer Gruppe am nächsten.

2.4. Fehlerbetrachtung

Wie bei allen experimentellen klinischen Arbeiten, so auch hier, ergeben sich eine Reihe von Fehlerquellen, die nun erörtert werden sollen.

2.4.1. Spezifität und Richtigkeit

In der hier verwendeten Orcin-Schwefelsäure-Methode (4) werden die gesamten im Serum befindlichen Polysaccharide säurehydrolysiert, und somit auch die nicht aus Spaltung der HÄS-Moleküle stammenden Monosaccharide im Nachweisverfahren mit erfaßt. Das Verfahren erscheint also zunächst wenig spezifisch. Nach Subtraktion der sehr spezifisch, enzymatisch, nachgewiesenen Glucose, mittels der Hexokinasemethode (47), verbleibt ein Basiswert vor Infusion der HÄS, dem die nicht näher unterschiedenen restlichen Zucker im Serum zuzuordnen sind.

Dieser Basiswert wird als individuell konstant angenommen und nach Infusion bei jeder Konzentrationsberechnung mit berücksichtigt. Da die Orcin-Schwefelsäure-Methode restlos alle Zucker mit erfaßt, bei einer überaus niedrigen Nachweisgrenze von $\geq 0{,}1$ ug Substanz, ist die Spezifität des Verfahrens nur durch die unbekannten Schwankungen der "Restzucker" beeinträchtigt. Um identische Verhältnisse zu haben, wurde mit Teilen derselben deproteinisierten Probe der Hexokinase-Ansatz und die Orcin-Schwefelsäure-Methode ausgeführt. Im Wege der Enteiweißung wäre eine Säurehydrolyse durch Perchlorsäure im Prinzip geringfügig möglich (51), beeinträchtigt aber den Gesamtwert nicht. Hingegen könnte eine verweggenommene HÄS-Hydrolyse durch Perchlorsäure die gelchromatographischen Ergebnisse verfälschen, der Fehler muß bei den niedrigen Reaktionstemperaturen und der geringen Säurekonzentration (46, 56) auf $< 1\%$ geschätzt werden. Diese Schätzung beruht auf Untersuchungen am Amylopektin. Über die Säurehydrolyse von HÄS finden sich keine Literaturhinweise.

2.4.2. Präzision

- Die Hexokinase-Methode ist das genaueste enzymatische Routineverfahren zur Bestimmung der Serumglucose. Durch Mehrfachbestimmungen abgesichert konnten hier die zufälligen Fehler auf eine Variationsbreite von $\pm$ 1% eingeschränkt und damit eine gute Präzision der Glucosewerte gesichert werden.

- Die Bestimmung der Gesamt-Kohlenhydrat-Konzentration mit dem Zuckeranalysator läuft, abgesehen von der manuellen Probenaufgabe, völlig automatisch. Die zufälligen Fehlerquellen liegen damit hauptsächlich in der Vorbereitung der Proben, der Probenaufgabe und der graphischen Auswertung der Peakintegrale. Zu Beginn und am Ende der Tagesmessungen wurde der Zuckeranalysator erneut geeicht. Die so vielfach

bestimmten Eichkurven der HÄS-Standard-Lösung waren von hoher Linearität und minimaler Tagesschwankung. Der Variationskoeffizient der Eichgeraden lag bei $< 2\%$. Diese Meßgenauigkeit darf also für die Gesamtkohlenhydratwerte ebenfalls angenommen werden. In zahlreichen Stichproben waren die einzelnen Werte mit dieser Präzision reproduzierbar.

- Der Gesamtfehler des Bestimmungsverfahrens für Glucose und Gesamtkohlenhydrate addiert sich auf eine maximale Variationsbreite $< 2{,}7\%$ der ermittelten HÄS-Konzentrationen.
- Eine schwer abschätzbare Fehlerursache liegt im Weg der Probe vom Patienten ins Labor. Es ist anzunehmen, daß die enzymatische Wirkung der Amylase auf die HÄS mit der Tiefkühlung ausreichend gestoppt ist. Eine Verzögerung von ca. 15 - 20 Minuten ist von der Blutentnahme bis zur hämolysefreien Abkühlung, Zentrifugation und endgültigen Tiefgefrierung in Rechnung zu stellen. Insofern entsprechen die gemessenen Kohlenhydratkonzentrationen zwar dem aktuellen Serumspiegel, die chromatographischen Ergebnisse, vor allem der Proben unmittelbar nach Infusion, geben die Verhältnisse bei der Probenentnahme nicht ganz exakt wieder.

3. Ergebnisse

3.1. Serum - HÄS - Konzentrationen

Die infundierte HÄS verteilt sich über die Blutzirkulation rasch im gesamten Gefäßsystem, wobei die im Serum vorhandenen α-Amylasen unverzüglich mit der enzymatischen Hydrolyse beginnen. Die renal eliminierbaren HÄS-Partikel gehen während der Nierenpassage verloren (14, 34 - 41), ein zweiter HÄS-Anteil wird offensichtlich durch das RES aufgenommen (19, 29). Ausgehend vom maximalen HÄS-Serumspiegel, unmittelbar nach Ende der Infusion, läßt sich dann ein kontinuierlicher Abfall der HÄS-Serum-Konzentrationen beobachten.

3.1.1. HÄS ($\bar{M}w$ 450.000/MS 0,7) im Serum

Hochmolekulare HÄS wurde 2 Gruppen von Versuchspersonen in unterschiedlichen Mengen infundiert.
Die Probanden der Gruppe I erhielten 10 ml HÄS 6%/kg KG entsprechend 600 mg HÄS/kg KG gleichkommt.
In Gruppe II wurden je 500 ml HÄS 6% gegeben, was einer durchschnittlichen Infusionsmenge von 8,12 ml HÄS 6%/kg KG oder 487 mg HÄS/kg KG.
In Gruppe I sinkt die HÄS-Serum-Konzentration im Mittel von 9,78 mg/ml nach Infusion auf 2,36 mg/ml also 24,1% nach 7 Tagen.
In Gruppe II verringert sich die maximale Konzentration von 7,85 mg/ml auf 2,02 mg/ml nach 5 Tagen, was einen Abfall auf 25,7% bedeutet.
Betrachtet man das Verhältnis der Infusionsmengen 487 mg/600 mg = 0,812, so findet sich ein annähernd gleicher Wert für das Verhältnis der Konzentrationen unmittelbar nach Infusion: 7,85 mg/9,78 mg = 0,803; der Verteilungsraum ist in beiden Gruppen nahezu gleich groß. Es ist bemerkenswert, daß sich die HÄS-Konzentration in Gruppe I nach 7 Tagen nahe dem 5-Tage-Wert der Gruppe II

bewegt, ersterer scheint durch die größere Menge an hochmolekularem HÄS langsamer abzufallen. Extrapoliert auf 7 Tage liegt die Gruppe II dann bei einem Wert von ca. 20 %.

3.1.2. HÄS ($\bar{M}w$ 40.000/MS 0,5 - 0,55)

Wie zu erwarten wird bereits eine geringere maximale Konzentration erreicht von 5,97 mg/ml, obwohl durchschnittlich 461 mg HÄS/kg KG appliziert wurden. Die überwiegend renale Elimination aus dem Intravasalraum geht schnell voran, nach 7 Tagen liegt der HÄS-Spiegel zwar noch bei 5,2%, ist aber nicht mehr signifikant von den Kohlehydratkonzentrationen vor Infusion zu unterscheiden.

Die Ergebnisse für alle drei Gruppen sind in Tab. 3.1 und Abb. 3.1 zusammengestellt.

Tab. 3.1

Gruppe I n = 10, *n = 4, HÄS (450.000/0,7)

	n.I.	2	5	168 h
$\bar{X}$ mg/ml	9,78	8,32	7,36	2,36
SD	0,87	1,12	0,68	0,30
%	100	85,1	75,3	24,2

Gruppe II n = 10, *n = 6, HÄS (450.000/0,7)

	n.I.	2	6	24	120*h
$\bar{X}$ mg/ml	7,85	6,60	5,52	3,62	2,02
SD	1,31	1,18	1,06	0,88	0,35
%	100	84,1	70,3	46,1	25,7

Gruppe III n = 8 *n = 6 HÄS (40.000/0,55)

	n.I.	2	6	24	72	168*h
$\bar{X}$ mg/ml	5,97	3,80	2,27	0,70	0,38	0,31
SD	0,94	0,94	0,74	0,31	0,30	0,27
%	100	63,6	38,0	11,7	6,4	(5,2) n. sign.

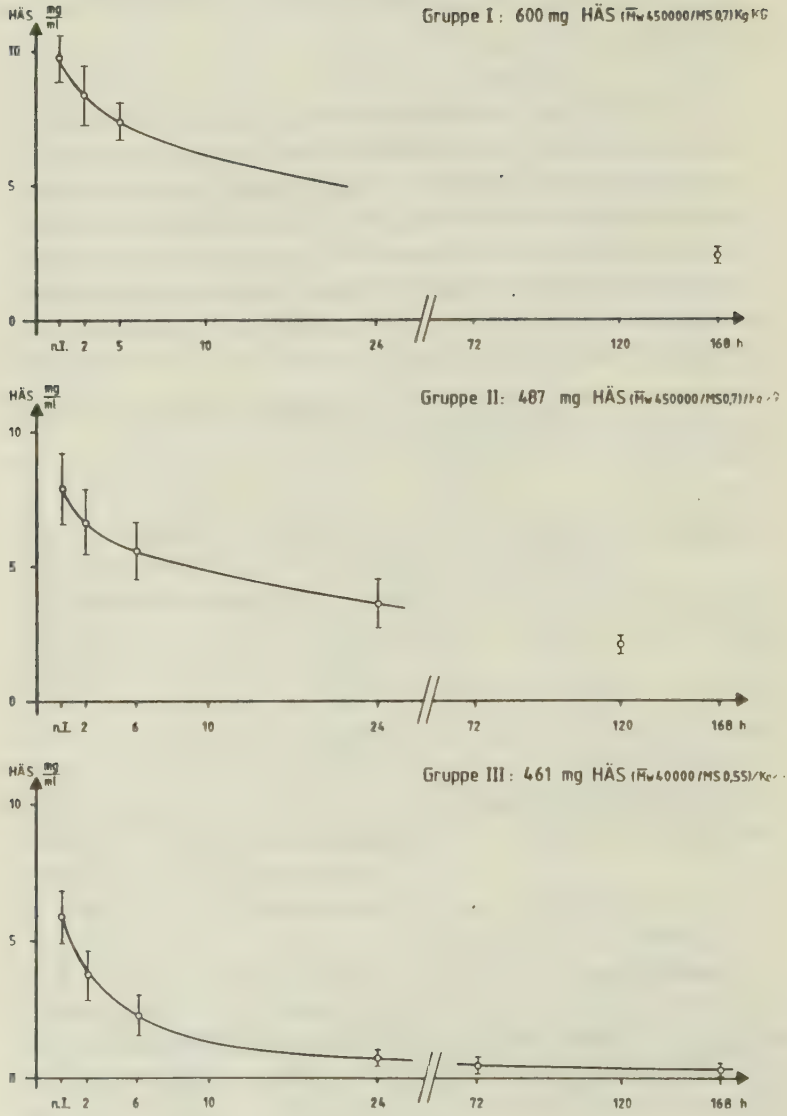


Abb. 3.1. HÄS-Serum Konzentrationen

3.2. Gelchromatographien von HÄS

Hydroxyäthylstärkelösungen bestehen aus einem Gemisch unterschiedlich schwerer HÄS-Moleküle. Ein Vergleich der Molekulargewichtsverteilung vor Infusion mit den Verteilungen nach Infusion gibt Anhaltspunkte für die Möglichkeiten und Grenzen des enzymatischen Abbaus der HÄS im Gefäßsystem und kann die relativ lange Verweilzeit von HÄS im Gefäßsystem erklären helfen.

3.2.1. Molekulargewichtsverteilung von HÄS ($\bar{M}w$ 450.000/MS 0,7) vor Infusion

Die Elution einer Probe der original HÄS-Infusionslösung ergab, mittels der hier verwendeten Säule, eine breite Molekulargewichtsverteilung im Bereich von ca. 900.000 - 30.000 (sh. Abb. 3.2). Die Verteilung erscheint rechtsschief wegen der logarithmischen Abszisse, das Maximum befindet sich im Bereich des MG 600.000, der Median liegt bei MG 370.000.
Oberhalb des mittleren MG von 450.000 befinden sich ca. 36% der HÄS. Unterhalb der Nierenschwelle von 60.000 finden sich noch 5,7%, d.h. 94,3% der hochmolekularen HÄS sind nicht unmittelbar nierengängig.

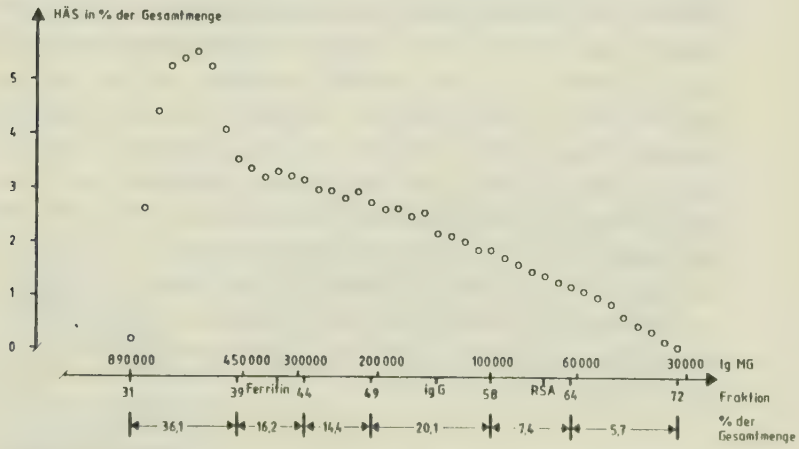


Abb. 32. Gelchromatographie: HÄS ($\bar{M}w$ 450000/MS 0,7) vor Infusion

3.2.2. Molekulargewichtsverteilungen von HÄS ($\bar{M}w$ 450.000/MS 0,7) nach Infusion

Für diesen Teil der Untersuchung wurden die Seren der Versuchspersonen Nr. 9 aus Gruppe I und Nr. 18 aus Gruppe II ausgewählt, ihre Meßwerte gaben die Mittelwerte ihrer Gruppen am besten wieder. Die Gelfiltrationen der beiden Probanden sind qualitativ identisch.

Nach Filtrationen der Proben vor Infusion ließen sich im Molekulargewichtsbereich > 30.000 keine Kohlenhydrate im Eluat nachweisen. Die dann bei kleineren MG, im Ausschlußbereich der Säule, gefundenen Zucker entsprechen überwiegend der Blutglucose sowie niedermolekularen Oligo- und Polysacchariden des Serums. Eine wirklich brauchbare Auftrennung ist im Bereich < MG 30.000 mit der verwendeten Säule nicht mehr anzunehmen.

Welche Veränderung die zuvor beschriebene ursprüngliche Molekulargewichtsverteilung der HÄS intravasal erfährt, wird anhand der in Abb. 3.3 und 3.4 wiedergegebenen Gelfiltrationen der Versuchsperson Nr. 9 sichtbar.
Bereits mit Ende der Infusion hat die vorher rechtsschiefe Verteilung einen glockenförmigen Verlauf im Bereich von MG 900.000 - 100.000 angenommen. Das Maximum der Kurve ist nun breiter geworden, es ist von MG 600.000 $\pm$ 50.000 nach MG 340.000 $\pm$ 60.000 verschoben. Daneben findet sich noch ein zweiter scharfer Peak zwischen MG 60.000 - 30.000, dessen Integral ca. 15% der eluierten Kohlenhydrate darstellt.
Insgesamt scheint im Filtrationsbereich < MG 60.000 ein Gemisch von HÄS-Bruchstücken und schon im Serum vorhandenen Kohlenhydraten aufzutreten. Für die Zucker oberhalb des MG 60.000 kommen nur HÄS-Moleküle in Betracht.

Nach 5 bzw. 7 Tagen geben die Molekulargewichtsverteilungen die quantitative Abnahme der Serum-HÄS-Spiegel wieder, qualitativ zeigen sich weniger eindrucksvolle Veränderungen. Die Glockenform der Verteilungen bleibt erhalten, engt sich aber mehr auf den Bereich MG 600.000 - 130.000 ein, die weiterhin breitgipfeligen Maxima liegen nun bei MG 270.000 ± 50.000. Die Verteilungen selbst werden jetzt eher linksschief, was einem stärkeren Rückgang der großmolekularen HÄS-Anteile entspricht, dennoch sind immer noch Anteile von HÄS-Molekülen > MG 600.000 nachzuweisen. Der steile Peak unterhalb MG 60.000 ist ebenfalls kleiner geworden, seine Fläche entspricht je einem rund 30%-Anteil am Gesamtkohlenhydratwert, er repräsentiert wieder die nicht der HÄS zuzuordnenden Zucker.
Die für die Verweilzeit der HÄS-Moleküle im Gefäßsystem relevanten Änderungen der Molekulargewichtsverteilung spielen sich also oberhalb des MG 60.000 ab.

Die Gegenüberstellung, in Tab. 3.2, der hier beschriebenen "in vivo"-Ergebnisse zu den von K. Schuster-Gossler (48) mit demselben Nachweisverfahren erzielten "in vitro"-Resultaten macht eindrucksvoll sichtbar, daß ein Teil der großmolekularen HÄS nicht enzymatisch abgebaut wird.

Tab. 3.2

MG Anteile in %	$4{,}5 \cdot 10^5$	$4{,}5 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$ - 10^5
HÄS-Lösung	36,1	16,2	14,4	20,1
nach Infusion	26,7	17,7	16,0	17,2
1 h - in vitro	18,5	15,0	17,0	22,0
168 h n. Infusion in % des Wertes nach Infusion	4,1	5,6	6,5	3,6
168 h - in vitro	8,0	14,0	14,5	26,0

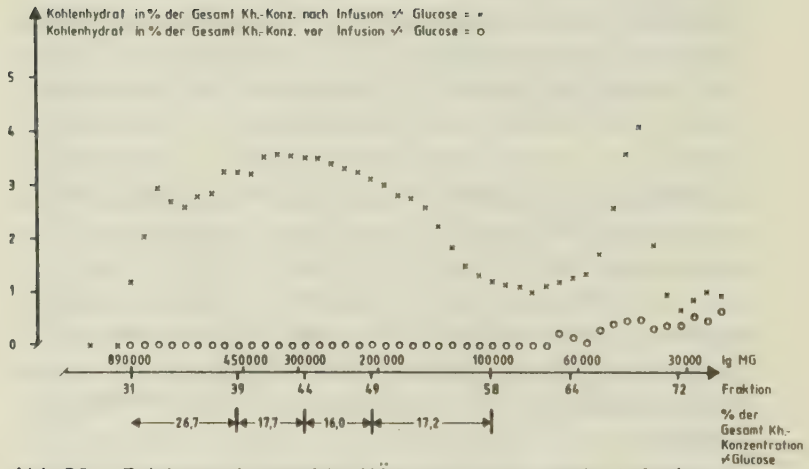


Abb. 3.3. Gelchromatographie: HÄS (Rw450000/MS 0,7) nach Infusion

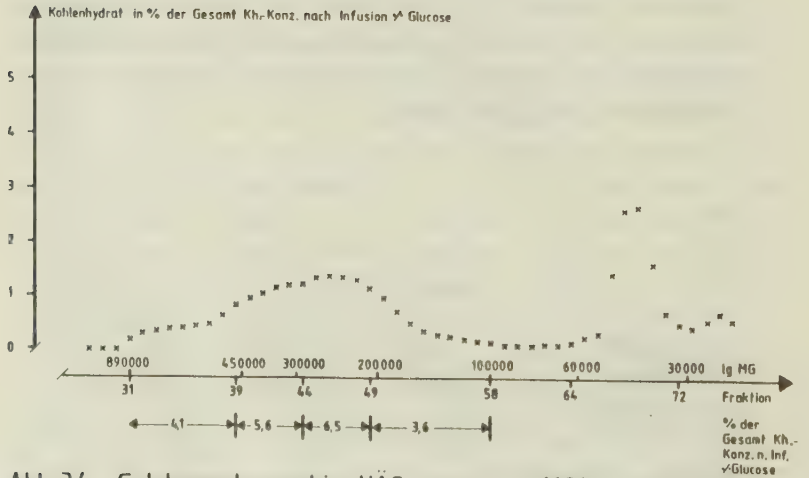


Abb. 3.4. Gelchromatographie: HÄS (Rw450000/MS 0,7) 168 h nach Infusion

Der maximale HÄS-Serumspiegel der Versuchsperson Nr. 9 beträgt 9,65 mg/ml, davon waren nach 7 Tagen noch 2,49 mg/ml = 25,9% nachzuweisen. Der HÄS-Anteil > MG 450.000 wird während der Infusion bereits von 36,1% auf 26,7% reduziert, die mittleren Molekülgrößen MG 450.000 - 200.000 nehmen prozentual leicht von 16,2% auf 17,7% bzw. von 14,4% auf 16,0% zu. In vitro findet eine ähnliche Verschiebung der Molekulargewichtsanteile während 1 h Inkubation statt, durch die insgesamt längere Einwirkzeit der α-Amylase ist die Verlagerung der MG-Verteilung nun zu niedrigeren Molekülen etwas mehr fortgeschritten.

Nach 7 Tagen findet man immer noch HÄS-Partikel > MG 450.000, deren Menge in vivo von 26,7% auf 4,1% deutlicher vermindert ist wie in vitro von 18,5% auf 8,0%.

In vitro bleibt die HÄS-Konzentration konstant, in vivo ist die renale Ausscheidung und die Aufnahme ins RES für das Abnehmen des HÄS-Serumspiegels verantwortlich. Qualitativ sind jedoch die Molekulargewichtsverteilungen oberhalb MG 200.000 "in vivo" und "in vitro" recht ähnlich. Auch im niedermolekularen Bereich ergibt sich eine gewisse Parallelität. Während "in vitro" die kleinen Bruchstücke vorhanden bleiben, sollten sie "in vivo" ausgeschieden sein, was aber nicht vollständig der Fall ist. Inwieweit HÄS-Amylase-Komplexe, die bereits von Köhler (21, 22) beschrieben wurden, für diesen zweiten Peak ursächlich sind, wurde hier nicht geklärt. Die Ergebnisse von Köhler erscheinen plausibel und können auch hier als Begründung gelten.

4. Zur Theorie des HÄS-Abbaus

Im vorhergehenden Teil dieser Arbeit ließ sich die maßgebliche Rolle der beiden Parameter $\overline{M}w$ und MS für die Verweildauer unterschiedlicher HÄS-Zubereitungen im Gefäßsystem eindrücklich demonstrieren. Während die Bedeutung des mittleren Molekulargewichts $\overline{M}w$ für die Möglichkeit zur glomulären Filtration einer HÄS-Sorte unmittelbar einsichtig ist, spielt der molare Substitutionsgrad MS eine weniger klar durchschaubare Rolle.
Bei genauerem Betrachten bisher bekannter Untersuchungen wird nämlich die enzymatische Stärkehydrolyse auf überaus komplexe Weise gehemmt, wenn an das Stärkesubstrat Hydroxyäthylgruppen gekoppelt sind. Substitutionsort und -grad an den Glucosemolekülen, die Verteilung der Hydroxyäthylgruppen in den Amylopektinmolekülen, die Größe derselben, ebenso die räumliche Struktur,sind bisher experimentell ermittelte Faktoren, die in die Variable MS eingehen und damit die Wahrscheinlichkeit der enzymatischen HÄS-Hydrolyse beeinflussen.

Das theoretische Feld ist hingegen noch wenig bearbeitet, insbesondere ist völlig unklar, welche Molekulargewichtsverteilung der Bruchstücke überhaupt erwartet werden kann, wenn eine begonnene Hydrolyse der Stärke durch Hydroxyäthylgruppen blockiert wird.
Im folgenden soll dieser Frage nachgegangen werden. Zuerst sind die wichtigsten bekannten Fakten über die Struktur von Stärke- und HÄS-Molekülen und ihrem enzymatischen Abbau zusammengestellt. Diese Kenntnisse werden dann in die Entwicklung eines mathematischen Modells einbezogen, das wiederum theoretische Daten für die zu erwartenden Molekulargewichtsverteilungen abgibt. Sie werden abschließend in der Diskussion den experimentellen Ergebnissen gegenübergestellt.

4.1. Daten und Fakten zu Amylopektin, HÄS und ihrer Hydrolyse durch α-Amylase

4.1.1. Struktur des Amylopektins

Amylopektinmoleküle besitzen eine globuläre Struktur, kürzere Ketten von 1-4-α-glykosidisch verbundenen Glucosemolekülen verzweigen sich 1-6-α-glycosidisch zu baumartigen Strukturen. Da die Zahl der Kettenglieder nicht festgelegt ist, hat die endgültige Gestalt eines jeden Amylopektinmoleküls zufälligen Charakter.
Als Beispiel sei hier in Abb. 4.1.1. das Modell von Gunja-Smith u.a. in (2) S. 34 übernommen:

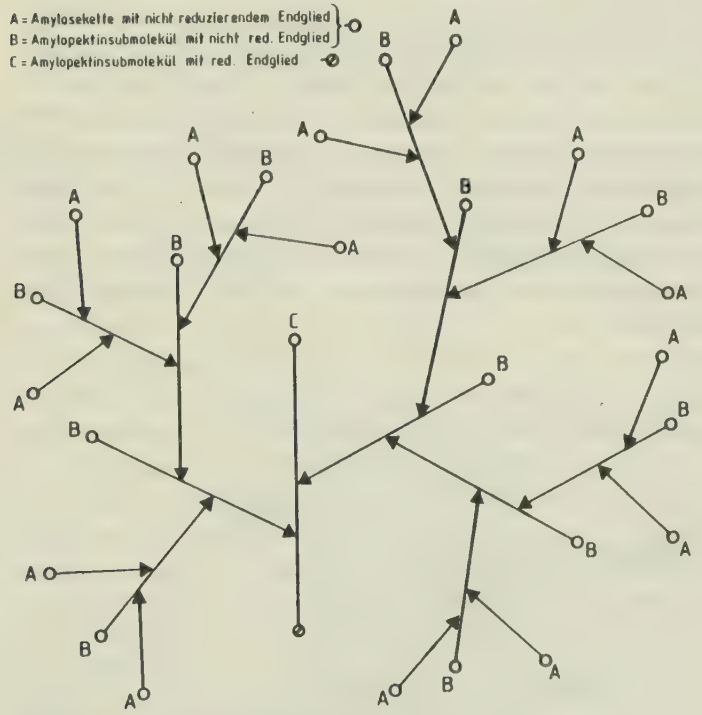


Abb. 4.1.1. Amylopektinmodell

Die Ketten (—►) zwischen den Verzweigungsstellen entsprechen niedermolekularer Amylose. Ihre Länge wurde nach spezifischer Spaltung der 1-6-α-Bindung gelchromatographisch im Bereich von 5 - 80 Glucosemolekülen gefunden, wobei das Maximum zwischen 10 - 40, also breit gestreut um 25 Glucoseeinheiten lag ((2) S. 35).

4.1.2. Enzymatischer Abbau von Amylopektin durch -Amylase

Während Amylo-1-6-α- Glucosidase nur die Verzweigungsstellen aufbricht, sind die Abschnitte dazwischen dem Endoenzym Amylo-1-4-α- Glucosidase, einer α-Amylase zugänglich.
Die α-Amylasen benötigen je nach Herkunft (Bakterien, Pankreas, Pflanzen etc.) eine unterschiedlich große Zahl von Haftstellen an der Substratkette, um diese teilen zu können; bei menschlicher- und Schweinepankreasamylase sind es ca. 5 Glucosemoleküle in einem Stärkemolekül (Robyt u. French, (2) S. 216). Für den weiteren Abbau einer Amylase gilt dann ein "multiple-attack-Prinzip" als gesichert, das in Abb. 4.1.2 (in Anlehnung an Greenwood & Milne, in (2) S. 219) veranschaulicht wird.

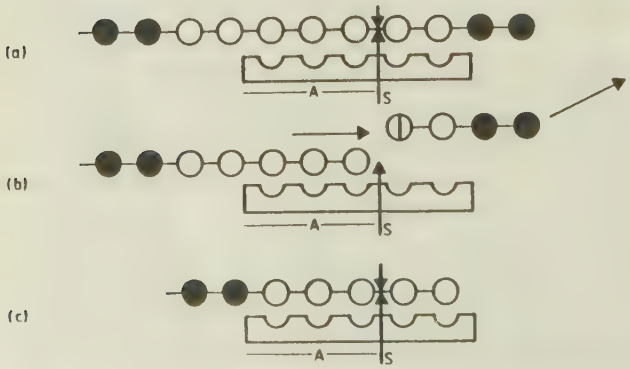


Abb. 4.1.2. Multiple Attack - Prinzip S = Spaltstelle

a) Ein inneres Amylosesegment wird durch die aktive Seite des Enzyms gebunden, die enzymatische Hydrolyse findet am Punkt a statt.
b) Nach der Spaltung sind die Adhäsionskräfte zwischen Enzym und Substratstücken verändert. Während die Kette mit nichtreduzierendem Ende wegdiffundiert, ist die Bindung zwischen Enzym und dem zweiten Substratanteil noch ausreichend um im nächsten Schritt
c) einen neuen Enzym-Substratkomplex entstehen zu lassen. Hieraus resultieren durch Wiederholung des ganzen Prozesses mehrere kleine Bruchstücke, im allgemeinen Maltose und Oligosaccharide.

Untersuchungen über die wahrscheinlichste Spaltstelle der Amylose und der zu erwartenden Bruchstücke (in (2) S. 216 - 233) unterstützen das vorher skizzierte Modell; das Enzym spaltet vorzugsweise in Nähe des reduzierenden Endes der Amylose.

Zu berücksichtigen ist auch die räumliche Zuordnung von Amylose und Stärkemolekül. Nur wenn sich beide in der notwendigen Orientierung begegnen, kann ein erfolgreicher, d.h. "hydrolytischer Kontakt" entstehen ((46) S. 456). Diese Aussage ist jedoch noch nicht näher erforscht und als hypothetisch zu werten.
Darüber hinaus ist die Geschwindigkeit der Spaltung vom Molekulargewicht des Substrats abhängig. Je schwerer die Amylose bzw. das Amylopektin ist, desto rascher werden sie enzymatisch zerlegt (16). Dies ist unmittelbar einsichtig: Ein großes Molekül bietet mehr Angriffspunkte. Interessant ist auch folgender Hinweis: Die Säurehydrolyse von Amylopektin verläuft zeitlich langsamer, verglichen mit der von Amylose. Die globuläre Struktur des Amylopektins scheint die tiefer im Molekül liegenden Bindungen zu schützen (51). Ähnliches ist für den enzymatischen Abbau, meiner Kenntnis nach, noch nicht erforscht. Eine analoge zeitliche Verzögerung, insbesondere bei HÄS als substituiertem Amylopektin, erscheint durchaus plausibel.

4.1.3. Der enzymatische Abbau von HÄS durch α-Amylase

Während die bisherigen Ausführungen nur unsubstituiertem Amylopektin galten, sind die Verhältnisse bei der enzymatischen Zerlegung von HÄS noch nicht in diesem Umfang geklärt. Die momentanen Erkenntnisse sind:

a) Die Angriffsmöglichkeiten für α-Amylasen sind abhängig von der aktuellen Position der Hydroxyäthylgruppen an der Glucose. Den besten Schutz bietet die Anlagerung am 2. Kohlenstoff, gefolgt von Substitutionen am 3. oder 6. Kohlenstoff der Glucose (61).

b) Auf Grund der räumlichen Ladungsverteilung im Glucosemolekül ist die Hydroxyäthylgruppe zu 80 Prozent am 2. Kohlenstoff zu erwarten, sofern der molare Substitutionsgrad unter MS = 1,4 bleibt (31).

c) Mit zunehmender MS wächst die Zahl der mehrfach, also doppelt und dreifach, substituierten Glucosemoleküle innerhalb des HÄS-Moleküls (31), d.h. MS kann größer 1 werden, der Substitutionsgrad DS kann jedoch maximal 1 erreichen. Die in der Literatur (3,31*, 39, 61) wiedergegebenen Relationen sind in Tab. 4.1. zusammengestellt:

Tab. 4.1.

MS	in %	50*	60	75	80*	90	110	125	130*
DS	in %	44	56	64	64	69	74	77	79
nicht subst.	in %	56	44	36	36	31	26	23	21

d) Eine effektive Hemmung der HÄS-Hydrolyse beinhaltet, daß die α-Amylase kein geeignetes HÄS-Substratstück findet, das sie noch "verdauen" könnte. Die Hydroxylierung von Amylopektin bedeutet, allein gesehen, noch keine Hemmung der Hydrolyse. Chan (8) konnte zeigen, daß auch hydroxylierte Amylose von α-Amylase noch zerlegt wird, wenn das Enzym auf geeignete Substitutionsmuster trifft, die genügend freie Stellen bieten. Die Wahrscheinlichkeit dafür sinkt jedoch mit zunehmendem MS.

e) Die Blutspiegelverläufe von HÄS mit $\bar{M}w$ 450.000 und $\bar{M}w$ 150.000 zeigen bei gleicher MS von 0,7 nach einer Zeit von 72 h nahezu dieselben prozentualen Anteile, bezogen auf die Anfangs-HÄS-Serum-Konzentration (39). Nach einer schnellen Anfangszerlegung verbleiben bei hoher MS die "schwer verdaulichen" (Bruch)-Stücke übrig.

f) Der zeitliche Ablauf der enzymatischen HÄS-Hydrolyse erscheint deutlich verzögert im Vergleich mit Amylopektin. So konnte nach ca. 4 h von Köhler (24) ein Volumenzweiteffekt festgestellt werden, der auf die erneute osmotische Wirkung der zwischenzeitlich entstandenen Spaltprodukte hinweist.

g) Die eigenen gelchromatographischen Untersuchungen der HÄS-Molekulargewichtsverteilungen eine Woche nach Infusion, und die anderer Autoren (37) bis zu sieben Wochen nach Infusion, weisen nach, daß bei MS = 0,7 innerhalb der im Serum verweilenden HÄS-Fragmente die höhermolekularen mit einem beachtenswerten Anteil zurückbleiben. Es kommt sogar (37) zu einer Verschiebung des Medians der Verteilung zurück in den Bereich größerer Molekulargewichte. Entsprechend dem Vorgenannten ist auch hier anzunehmen, daß hochsubstituierte, hochmolekulare Bruchstücke sehr "resistent" gegenüber der Amylase sind, bzw. es ist zu diskutieren, inwieweit der α-Amylase überhaupt noch ein Abbau gelingt.

h) Das "multiple-attack-Prinzip", sh. 4.1.2 c scheint auch für HÄS-Moleküle zu gelten; Schuster-Gossler registrierte Maltose und Glucose in zunehmender Menge, wenn die HÄS-Konzentration größer wurde, dies fand sich in vivo wie in vitro.

4.1.4. Das idealtypische HÄS-Molekül

Im Hinblick auf einen mathematischen Lösungsweg sei das bisher Genannte in ein modellhaftes, ideales HÄS-Molekül zusammengefaßt, dem die experimentellen Mittelwerte als feste Größe zu Grund liegen. Im einzelnen:

- Die Amyloseketten (sh. 4.1.1) seien alle gleich lang (z.B. 25 Glucosemoleküle) und dann 1-6-α-glycosidisch verzweigt.
- Der molare Substitutionsgrad MS wird von jeder Amylosekette exakt eingehalten und ist nicht nur als Mittelwert für das gesamte Amylopektinmolekül zu sehen.
- Ebenfalls pro Amylosekette sind die prozentualen Anteile der Mehrfachsubstitutionen fest eingehalten (sh. 4.1.3. b,c).
- Die am 6. Kohlenstoffatom anliegenden Hydroxyäthylgruppen haben dieselbe hemmende Wirkung wie die mit dem 2. Kohlenstoffatom der Glucose verknüpften (sh. 4.1.3 a).
- Die Amylosekette sei spaltbar, wenn sich ein unsubstituierter Abschnitt findet, der mindestens die Enzymlänge hat. Die eventuell zusätzlich vorhandenen substituierten, aber dennoch spaltbaren Stellen (sh. 4.1.3 d) werden hier nicht berücksichtigt, da auch nicht genau bekannt ist, welche Kombinationen dafür in Frage kommen.

Das Bild eines idealtypischen HÄS-Moleküls zeigt die Abb. 4.1.3, vgl. dazu Abb. 4.1.1:

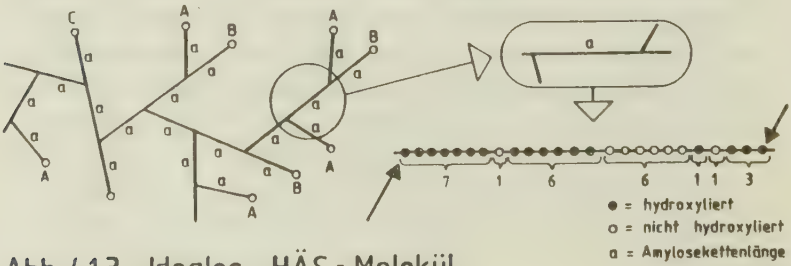


Abb. 4.1.3. Ideales HÄS - Molekül

4.2. Überlegungen aus der Kombinatorik und der Wahrscheinlichkeitstheorie

Nach den genannten Voraussetzungen ist der Gedanke reizvoll, mittels kombinatorischer Methoden, Aussagen über die Hydrolysewahrscheinlichkeit von HÄS-Molekülen durch α-Amylase zu entwickeln.
Die allgemeine mathematische Formulierung des Problems wird anschließend auf konkrete Beispiele von Glucosemolekülketten bzw. HÄS-Molekülen angewendet.

4.2.1. Das mathematische Instrumentarium

Gegeben: Eine Molekülkette der Länge (a + b)
wobei

a = Zahl der nicht hydroxylierten Moleküle (n)
b = Zahl der hydroxylierten Moleküle (h)
e = Länge des Enzyms in Glucosemoleküleinheiten

Gesucht: P_s=die Spaltungswahrscheinlichkeit einer Kette

$$P_s = \frac{\text{Zahl der enzym. hydrolysierbaren Ketten}}{\text{Zahl aller möglichen unterscheidbaren Ketten}}$$

$$= \frac{s}{\binom{a+b}{a}}$$

Die Zahl aller möglichen unterscheidbaren Ketten ist durch den Binomial-Koeffizienten

$$\binom{a+b}{a} = \binom{a+b}{b} = \frac{(a+b)}{a!\ b!} \qquad (I)$$

gegeben, unter Berücksichtigung der bekannten Vorschriften

$$a! := 1 \cdot 2 \cdot 3 \cdot 4 \cdots (a-1) \cdot a$$

(für alle positiven ganzen Zahlen a)

$$0! := 1; \quad \binom{a}{b} = \frac{a!}{(a-b)!\ b!},$$

$$\binom{a}{0} = 1; \quad \binom{a}{a} = 1; \qquad \binom{a}{b} = 0, \text{ für } a < b$$

Mit steigender Kettenlänge wird die durch (I) berechenbare Zahl der Möglichkeiten zwar stets endlich und ab-

zählbar bleiben und dennoch rasch unüberschaubar werden. Die Zahl s der enzymatisch hydrolysierbaren Ketten ist schwieriger zu finden. Von den $\binom{a+b}{a}$ Möglichkeiten kommen nur solche Kombinationen in Frage, die mindestens ein ununterbrochenes Teilstück nichthydroxylierter Moleküle der Länge $l_i < e$ besitzen.

Die mathematischen Hilfen zur Lösung dieses Problems bieten die Regeln und Sätze der kombinatorischen Analysis, wie sie u.a. für Besetzungszahlenprobleme in der Physik (Maxwell-Boltzmann-, Bose-Einstein-, Fermi-Dirac-Statistik) und in der Verfahrenstechnik zur Homogenitätsprüfung von Serienprodukten angewendet werden (10).

Der von mir auf dieser Grundlage entwickelte Lösungsweg sei kurz skizziert:
Eine der möglichen Kombinationen von (I) sehe folgendermaßen aus:

$$\underbrace{h\,h\,h\,h\,h\,h\,h}_{7}\;\underbrace{n}_{1}\;\underbrace{h\,h\,h\,h\,h\,h}_{6}\;\underbrace{n\,n\,n\,n\,n\,n}_{6}\;\underbrace{h}_{1}\;\underbrace{n}_{1}\;\underbrace{h\,h\,h}_{3}$$

n = nichthydroxyl. Glucosemoleküle
h = hydroxyl. Glucosemoleküle

Eine ununterbrochene Folge i gleicher Elemente heiße ein Lauf l_i. Im Beispiel beginnt die Kette mit einem Lauf von "h's" der Länge 7: l_7 (h), gefolgt von einen "n-Lauf" der Länge 1: l_1 (n), sowie weiteren Läufen der Längen 6, 6, 1, 1, 3.
Die jeweilige Anzahl der Läufe von "h's" einer bestimmten Länge l_i (h) ist im Beispiel:

$$l_1\,(h) = 1 \qquad l_4\,(h) = l_5\,(h) = 0$$
$$l_2\,(h) = 0 \qquad l_6\,(h) = l_7\,(h) = 1$$
$$l_3\,(h) = 1 \qquad l_i\,(h) = 0 \text{ für } i \neq 7$$

und $$l\,(h) = \sum_{i}^{b} l_i\,(h) = 4$$

Analog gilt für: $$l\,(n) = \sum_{i}^{a} l_i\,(n) = 3$$

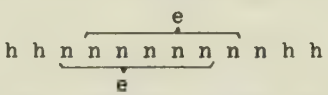
Wenden wir uns im weiteren speziell den nicht-substituierten Glucosemolekülen n zu. Diese können in $1 \leqslant a$ Läufen unterschiedlicher Längen im Gesamtmolekül verteilt sein.
Es gibt

$$\frac{1}{l_1!\, l_2! \cdots l_k!} \binom{b+1}{l} \qquad (k > 0) \qquad \text{(II)}$$

Möglichkeiten dafür (10, S.60).
Nun ist diese allgemeine Aussage noch daraufhin einzuschränken, daß nur solche Kombinationen berücksichtigt werden, die mindestens einen Lauf der Länge $i \geqslant e$ enthalten. Damit ist die gewünschte Voraussetzung einer entsprechend langen, spaltbaren Stelle erfüllt, deren Gesamtzahl $\bar{s}$ im ersten Wert berechnet ist.

Eine Unterscheidung ist noch zu treffen. Nach der Wahrscheinlichkeitstheorie bietet ein Lauf der Länge $i > e$ mehrere versetzte Ansatzpunkte für das Enzym:

z.B.



Im folgenden ist diese Situation im zweiten Wert s berücksichtigt, der etwas größer ausfällt und letztlich aussagt, daß Glucose und Maltose-Spaltprodukte gehäufter anfallen.
Mittels Formel II lassen sich jetzt die günstigen Fälle berechnen:

$a < e$: keine Spaltung möglich

$a = e$: Es kommen nur die wenigen Fälle in Frage, bei denen die gesamten unsubstituierten Moleküle in einem Lauf auftreten:

$$l = l_e = 1$$

$$P(\bar{s}_e) = (b+1) \cdot \binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$P(s_e) = (b+1) \cdot \binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$P(\bar{s}_e) = P(s_e)$$

$a = e + 1$: Es gibt wieder die Möglichkeit, alle "n's" in einem Lauf anzutreffen:

$$l = l_{e+1} = 1$$

und die Fälle in denen zwei Läufe mit:

$$l = l_1 + l_e = 1 + 1 = 2 \text{ vorliegen}$$

sind ebenfalls günstig. Es wird

$$\bar{s}_{e+1} = \binom{b+1}{1} + \frac{2!}{1!\,1!}\binom{b+1}{2}$$

$$= (b+1) + b(b+1) = (b+1)^2$$

$$P(\bar{s}_{e+1}) = (b^2 + 2b + 1)\cdot\binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$= (b+1)^2 = b^2 + 2b + 1$$

$$s_{e+1} = 2\binom{b+1}{1} + \frac{2!}{1!\,1!}\binom{b+1}{2}$$

$$= 2(b+1) + b(b+1)$$

$$= (b+1)^2 + (b+1)$$

$$P(s_{e+1}) = (b^2 + 3b + 2)\cdot\binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$= b^2 + 3b + 2$$

$a = e + 2$: Analog zum vorigen ergeben sich als geeignete Läufe:

$$l = l_{e+2} = 1$$

$$l = l_1 + l_{e+1} = 1 + 1 = 2$$

$$l = l_2 + l_e = 1 + 1 = 2$$

$$l = l_1 + l_e = 2 + 1 = 3$$

Nach Berechnung werden die Spaltwahrscheinlichkeiten

$$P(\bar{s}_{e+2}) = 1/2\,(b^3 + 4b^2 + 3b + 2)\cdot\binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$P(s_{e+2}) = 1/2\,(b^3 + 6b^2 + 11b + 6)\cdot\binom{a+b}{a}^{-1}$$

sein.

$$a = e + 3: \quad P(\bar{s}_{e+3}) = 1/6\ (b^4 + 7b^3 + 17b^2 + 17b + 6) \cdot \binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$P(s_{e+3}) = 1/6\ (b^4 + 16b^3 + 35b^2 + 44b + 24) \cdot \binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$a = e + 4: \quad P(\bar{s}_{e+4}) = 1/24\ (b^5 + 11b^4 + 21b^3 + 85b^2 + 98b + 24) \cdot \binom{a+b}{a}^{-1}$$

$$P(s_{e+4}) = 1/24\ (b^5 + 15b^4 + 61b^3 + 225b^2 + 298b + 120) \cdot \binom{a+b}{a}^{-1}$$

Im Prinzip läßt sich das Verfahren so weiter führen, die gewünschten Aussagen können aber jetzt schon getroffen werden.

Als allgemeines Ergebnis darf festgehalten werden:

- Die Zahl der für eine enzymatische Hydrolyse geeigneten Kombinationen entwickelt sich gemäß einem Polynom von b:

  Für: $a = e + k < b$:

  $$\bar{s}_{e+k} = \sum_{j=o}^{k+1} m_j \cdot b^j \quad (\text{f. } j \in \mathbb{N},\ m_j \in \mathbb{R}) \quad \text{(III)}$$

- Ist die Enzymlänge $e < a$ fest vorgegeben, so steigt die Zahl der Möglichkeiten laut (III) potenziert in Abhängigkeit von der Differenz

  $$a - e = k = k(a).$$

  Ist der Anteil der nicht substituierenden Glucose aus der gesamten Kette: a / (a + b) groß, wird k(a) wachsen und damit in (III) zu größeren Potenzen führen. Es gilt deshalb

  $$P(s_e) < P(s_{e+1}) \quad \ldots < P(s_{e+k}) \text{ f. } a = e + k$$

  Ein allgemeiner, aber aufwendiger Beweis für

  $$P(s_{e+k}) < P(s_{e+k+1})$$

  ist möglich.

4.2.2. Angewandte Mathematik

Ich möchte mich hier darauf beschränken, mit Hilfe der im vorigen Abschnitt errechneten Spaltwahrscheinlichkeiten, an Beispielen die Konsequenzen für verschiedene HÄS-Moleküle darzulegen unter Verwendung experimenteller Daten.

- Wie bereits unter 4.1.1. beschrieben beträgt die mittlere Kettenlänge zwischen 2 Verzweigungspunkten etwa 20 - 25 "Glucoseeinheiten".
- Das Molekulargewicht von Anhydroglucose in der Kette beträgt 162, das MG des einfach substituierten Anhydroglucosemoleküls 206. Das mittlere Molekulargewicht der Zuckerbausteine einer Kette errechnet sich dann in Abhängigkeit vom molaren Substitutionsgrad MS:

$$\overline{MG}\ (Gluc.) = (162 + 44 \cdot MS)$$

- Damit läßt sich bei vorgegebenen MG des HÄS-Moleküls die Zahl der Ketten ermitteln:

$$Z = MG(HÄS)/((a + b) \cdot \overline{MG}(Gluc.))$$

- Das Verhältnis von molarer Substitution MS zum Substitutionsgrad DS wird Tab. 4.1 entnommen.
- Die Enzymlänge sei e = 5, (sh. 4.1.2).

Unter diesen Vorgaben läßt sich die theoretische Spaltungswahrscheinlichkeit eines HÄS-Moleküls mit Hilfe der Formeln aus 4.2.1. berechnen.

Beispiel:

HÄS (Mw 450.000/MS 0,7; DS 0,61)

Die Zahl der Glucoseeinheiten in einer Kette sei 23.

Damit stehen die Parameter fest:

a = 9 nicht substituierte Glucosemoleküle

b = 14 substituierte Glucosemoleküle

$k = a - e = 4$

$DS = \frac{b}{a + b} = 0{,}61$, d.h. $MS = 0{,}7$

$\overline{MG}(Gluc.) = (162 + 44 \cdot 0{,}7) = 192{,}8$

$Z = 450.000 / (23 \cdot 192{,}8) = 101$

$$P(\overline{s}_{e+4}) = 1/24\ (14^5+11\cdot14^4+21\cdot14^3+85\cdot14^2 +98\cdot14+24)\cdot\binom{23}{9}^{-1}$$

$= 49.170 / 817.190$

$= 0{,}052827$

$$P(s_{e+4}) = 1/24\ (15^5+15\cdot14^4+61\cdot14^3+225\cdot14^2 + 298\cdot14+120)\cdot\binom{23}{9}^{-1}$$

$= 55.410 / 817.190$

$= 0{,}067805$

Die Wahrscheinlichkeit einer Kette, nicht gespalten zu werden, ist

$$1 - P(\overline{s}_{e+4}) = 0{,}947173$$

bzw. $1 - P(s_{e+4}) = 0{,}932195$

Die Wahrscheinlichkeit, das vorgegebene HÄS-Molekül nicht enzymatisch zerlegen zu können, beträgt

$$(1 - P(\overline{s}_{e+4}))^Z = 0{,}947173^{101} = 0{,}43\ \%$$

bzw. $(1 - P(s_{e+4}))^Z = 0{,}932195^{101} = 0{,}08\ \%$

Das heißt: 0,43 % der in diesem Beispiel ausgewählten HÄS-Moleküle haben keine geeignete spaltbare Stelle in ihren Glucoseketten. Selbst wenn die Molekülabschnitte, die dem Enzym mehrere Angriffspunkte bieten, entsprechend der Wahrscheinlichkeitstheorie berücksichtigt werden, verbleibt ein unauflösbarer Restbestand von 0,08 %.

In Tab. 4.2.2 sind die Ergebnisse für weitere Beispiele zusammengestellt und in Abb. 4.2.1 graphisch veranschaulicht, wobei der Übersicht halber nur die Zahlen der spaltbaren HÄS-Molekülabschnitte $\overline{s}_{e+k}$ berücksichtigt sind.

Tab. 4.2.2 *MS nach Tab. 4.2.1 Enzymlänge e = 5

Kettenlänge	a + b	DS b/(a + b)	MS* ca.	MG (Gluc.)	k	$P(\overline{s}_{e+k})$	keine Spaltstelle in % Wahrscheinlichkeit 900000	675000	450000	220000	110000	55000
17	a = 8 b = 9	0,53	0,55	186,2	3	0,090	0	0	0	0,1	3,7	20,1
	a = 7 b = 10	0,58	0,65	190,6	2	0,037	0	0	0,5	7,7	27,8	52,7
	a = 6 b = 11	0,65	0,80	197,2	1	0,009	8,9	16,2	29,8	55,1	74,2	86,5
20	a = 9 b = 11	0,55	0,60	188,4	4	0,090	0	0	0	0,4	6,6	24,4
	a = 8 b = 12	0,60	0,70	192,8	3	0,047	0	0	0,4	6,4	24,8	51,0
	a = 7 b = 13	0,65	0,80	197,2	2	0,019	1,3	3,8	11,2	34,2	64,3	79,4
23	a = 9 b = 14	0,61	0,70	192,8	4	0,053	0	0	0,4	6,6	25,6	52,0
	a = 8 b = 15	0,65	0,80	197,2	3	0,027	0,4	1,7	6,7	26,9	51,8	72,0
	a = 7 b = 16	0,69	0,90	201,6	2	0,010	14,2	23,1	37,7	62,3	78,6	88,6
25	a = 9 b = 16	0,64	0,75	195,0	4	0,038	0,1	0,3	3,2	18,2	42,6	65,3
	a = 8 b = 17	0,68	0,90	201,6	3	0,019	3,2	7,6	18,1	43,0	65,6	81,0
	a = 7 b = 18	0,72	1,05	208,2	2	0,007	27,3	37,7	52,5	73,0	85,3	92,8
28	a = 9 b = 19	0,68	0,85	199,4	4	0,026	1,4	4,1	11,8	35,8	59,9	76,8
	a = 8 b = 20	0,71	1,00	206,0	3	0,012	15,2	24,4	39,0	63,2	79,5	88,6
	a = 7 b = 21	0,75	1,15	212,6	2	0,004	54,6	63,6	73,7	86,2	93,0	96,5

Legende

DS:
Anteil hydroxäthylierter Glucose in einer Kette

MS:
molarer Substitutionsgrad, einschließlich mehrfacher Substitutionen

MG(Gluc.):
Durchschnittliches Molekulargewicht aller Glucosemoleküle einschließlich der substituierten in einer Kette

k:
Anzahl der nicht substituierten Glucose zusätzlich zur Enzymlänge e

$P(\overline{s}_{e+k})$:
Spaltwahrscheinlichkeit für eine Kette

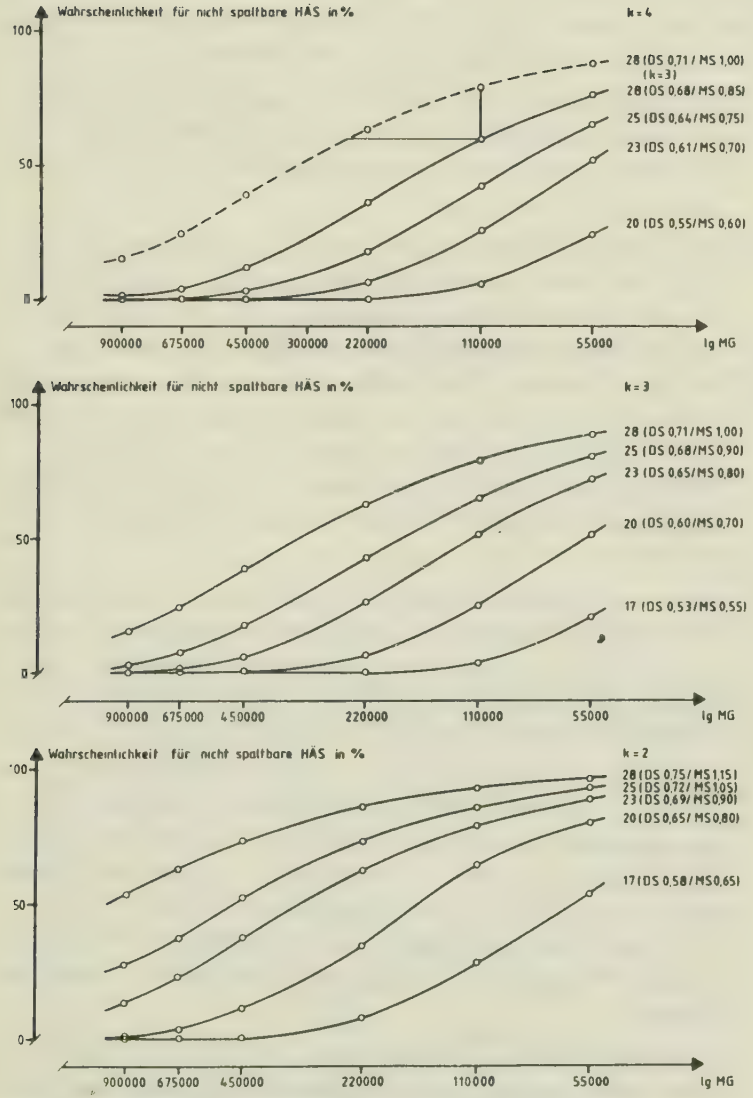


Abb. 4.2.1. Wahrscheinlichkeit für nicht spaltbare HÄS

4.2.3. Einflüsse auf die theoretische Hydrolysewahrscheinlichkeit von HÄS

Aus den obigen Berechnungen lassen sich graphisch die Einflüsse verschiedener Parameter auf die theoretische Spaltbarkeit der HÄS-Moleküle demonstrieren:

1. Molekulargewicht der HÄS: Mit zunehmendem MG sinkt die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden nicht spaltbarer HÄS-Moleküle exponentiell gegen Null (sh. Abb. 4.2.1).

2. Grad der Substitution DS: Die Spaltwahrscheinlichkeit der HÄS-Submoleküle (Hydroxyäthyl-Amylose) verringert sich ebenfalls exponentiell mit zunehmendem Substitutionsgrad (sh. Abb. 4.2.2). Über eine geringe Änderung des Substitutionsgrades lassen sich die Möglichkeiten einer enzymatischen Hydrolyse sehr viel stärker steuern, als über die Variation des Molekulargewichts. So entspricht in Abb. 4.2.1 die Verdoppelung der MG einer Zunahme des Substitutionsgrades DS von 0,03.

3. Länge der HÄS-Subketten: Bei gleichem Substitutionsgrad finden sich unter längeren Hydroxyäthyl-Amylose-Ketten mit größerer Wahrscheinlichkeit solche, die eine Spaltstelle besitzen (sh. Abb. 4.2.2). Bei gleichem Gewicht der HÄS-Gesamtmoleküle wirkt sich die größere Anzahl kürzerer Ketten aber stärker potenzierend auf die Spaltwahrscheinlichkeit für das gesamte Molekül aus. Schon bei einem niedrigen MG 220.000, hat die Kettenzahl den stärkeren Effekt (sh. Abb. 4.2.3). Dies führt dazu, daß solche Moleküle aus kürzeren Ketten trotz geringeren "Einzelchancen" insgesamt größere Spaltwahrscheinlichkeiten haben.

Die Schlußfolgerung lautet also, daß die enzymatische Abbauwahrscheinlichkeit überwiegend vom Substitutionsgrad, in zweiter Linie von der Länge der HÄS-Abschnitte

Abb. 4.22. Wahrscheinlichkeit einer spaltbaren Stelle in der Amylosekette in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad

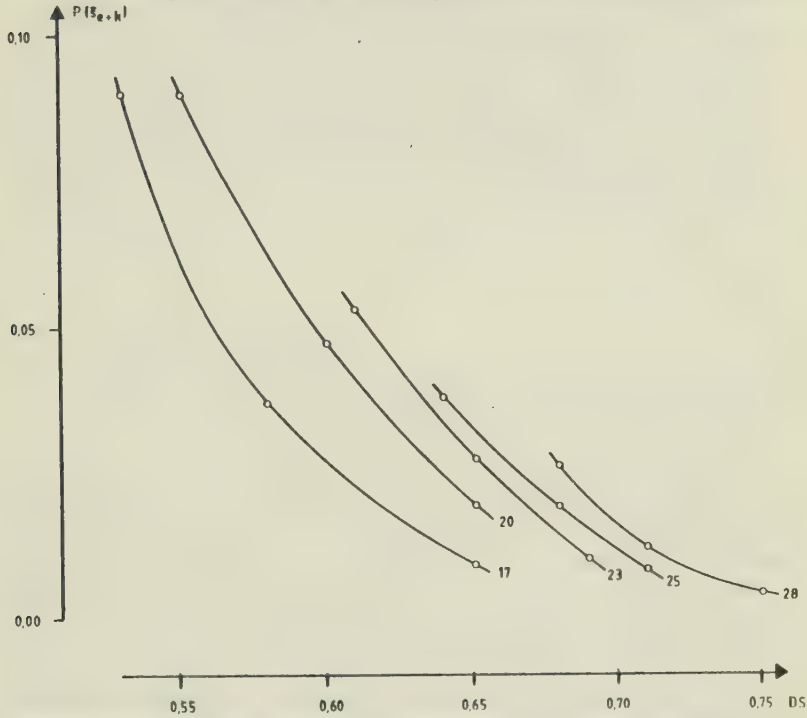
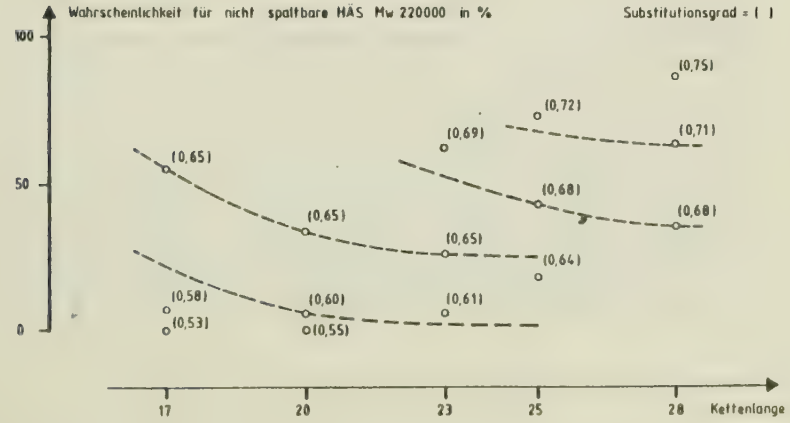


Abb. 4.23. Keine Spaltstelle in % Wahrscheinlichkeit für HÄS Mw 220000 in Abhängigkeit von der Amylosekettenlänge



zwischen den 1-6-α-glykosidischen Verzweigungen und dann erst vom Gewicht der HÄS-Gesamtmoleküle beeinflußt wird. Es bestehen also theoretisch für höher substituierte HÄS ansehliche Erwartungswerte für nicht spaltbare Moleküle, insbesondere wenn sie einen kleinen Anteil kürzerer Hydroxyäthyl-Amylose-Abschnitte haben und dem mittleren und unteren Molekulargewichtsbereich angehören.

5. Diskussion

Widersprüchliche Beurteilungen der intravasalen Verweildauer von HÄS-Präparaten gaben den Anstoß zu dieser Arbeit. Damit verbanden sich die vom klinischen Standpunkt aus wichtigen Fragen wie HÄS abgebaut und aus dem Gefäßsystem ausgeschieden wird. Letztlich sollte also eingehend geklärt werden, ob eventuell Dosisbegrenzungen für einfache oder wiederholte Gaben von HÄS-Lösungen notwendig sind.

5.1. Nachweisverfahren

Die weitaus meisten Untersuchungen zur Pharmakokinetik von HÄS wurden mit dem Anthron-Verfahren durchgeführt (1, 7, 11, 19, 24, 33, 34, 37, 38, 42, 52, 53, 54). Dabei werden aus Sacchariden unter starkem Erhitzen in Mineralsäuren Furfurole gebildet, die durch Kondensation mit Phenolderivaten Farbreaktionen ergeben. Das hier verwendete Orcin-Verfahren gehört in dieselbe Gruppe. Bei solchem Vorgehen werden alle Zucker erfaßt und letztlich die HÄS-Konzentration aus der Differenz zwischen der Gesamtkohlenhydratkonzentration und der enzymatisch nachgewiesenen Blutglucose ermittelt. In Vorversuchen erwies sich die Verwendung von Orcin gegenüber Anthron hinsichtlich der Reproduzierbarkeit von Testdosen als überlegen. Ursächlich ist der raschere zeitliche Verfall des Anthron-Schwefelsäure-Reagenz, sowie dessen stärkere Schwankungen der Färbeintensität in Abhängigkeit von der Dauer der Erhitzungsphase im Reaktionsbad (H. Bauer, unveröffentlichte Ergebnisse). Die zusätzlichen Optimierungen durch einen automatisierten Reaktionsablauf und die analoge Registrierung ermöglichten den verläßlichen Nachweis auch sehr geringer Mengen von Kohlenhydraten. So ist für die HÄS-Bestimmung im Eluat von Chromatographien, im Gegensatz zu den überwiegend von

Mishler (11, 37, 38) durchgeführten Untersuchungen keine "Eindickung" der Proben erforderlich, um über Brechungsindexschwankungen Substrat nachzuweisen.

Die Verwendung von HÄS-Antikörpern hat sich bisher als wenig zuverlässig erwiesen. Vor allem lassen sie sich wohl wegen der geringen HÄS-Antigenität schwer herstellen und reproduzieren (57, 59). Da die bisher vorliegenden Meßergebnisse widersprüchlich (7, 29) sind, bot sich dieses Vorgehen nicht als Alternative an.

Den Vorzügen des Orcin-Verfahrens steht als Nachteil gegenüber, daß die HÄS-Konzentrationen im Serum letztendlich nur indirekt aus den Differenzen zweier Bestimmungsmethoden berechnet werden können. Für den reinen HÄS-Nachweis ist der von Wicarkzyk (59) beschrittene Weg einer modifizierten Glykogenbestimmung eine beachtenswerte Alternative. Dabei werden die HÄS-Moleküle nach entsprechenden Vorbereitungen ebenfalls hydrolysiert und die so entstandene Glucose enzymatisch bestimmt. Auch Köhler (21 - 25) hatte zuvor schon einen ähnlichen Untersuchungsgang gewählt. Diese Verfahren erfordern aber mehr Schritte und sind in ihren Nachweisgrenzen eher limitiert. Werden zudem fast alle HÄS-Anteile sowieso gelchromatographisch fraktioniert, erscheint der Weg einer enzymatischen Auswertung des hydrolysierten Eluats umständlicher.

Das Orcin-Schwefelsäure-Verfahren, wie es hier mit dem Zuckeranalysator umgesetzt wurde, ist eine optimierte Furfurolmethode. Wegen seiner unkomplizierten Handhabung, der guten Präzision und Sensibilität ist es dem Anthron-Verfahren überlegen. Es ist insbesondere für gelchromatographische Untersuchungen sehr praktisch. Für kleinste Substanzmengen ist es auch aus methodischen Gründen den enzymatischen Bestimmungen vorzuziehen, da z.B. bei der Auswertung der eluierten Fraktionen der Grenzbereich des Enzymüberschuß berührt wird.

5.2 Experimentelle Ergebnisse

Die Bestimmung der HÄS-Serumspiegel wurde in dieser Arbeit nicht mit dem Anspruch verknüpft, eine klassische Pharmakokinetik der beiden untersuchten HÄS-Varianten zu erheben. Dafür wären ca. 15 Meßpunkte innerhalb eines Intervalls von 5 Halbwertszeiten erforderlich gewesen und nur letzteres wurde eingehalten. Einschränkend muß zudem prinzipiell angemerkt werden,daß die Pharmakokinetik für jedes der bekannten HÄS-Präparate letztlich eine Resultierende ist. Die im Gemisch eines mittleren Molekulargewichts enthaltenen HÄS-Molekülgruppen tragen in individuellen Abbauraten zur Gesamtkinetik bei. Eine Veränderung der Molekulargewichtsverteilung von im Gefäßsystem verbleibender HÄS kann also pharmakokinetisch nicht richtig erfaßt werden.

Insofern galt es erstmals, den Nachweis von HÄS im Serum mit dem Orcin-Verfahren zu optimieren und die so gewonnenen Resultate mit denen anderer Untersuchungen zu vergleichen. Im zweiten Schritt wurde das Orcin-Verfahren in der Auswertung von Gelfiltrationen angewandt. Ein direkter Vergleich mit anderen Arbeiten wird durch Abweichungen in den Infusionsmengen, der Infusionszeit sowie des meist unbekannten Verteilungsvolumen der Versuchspersonen erschwert. Die Beurteilung muß sich deshalb vor allem auf den prozentualen Verlauf beziehen.

Die in Gruppe I und II gemessenen HÄS-Serumspiegel unmittelbar nach Infusionsende liegen in den selben Größenordnungen, wie sie von anderen Autoren mit anderen Verfahren (7, 24, 33, 34, 37, 42, 59) gefunden wurden, insgesamt eher etwas höher.

Keine wesentliche Abweichung ergibt sich hinsichtlich der orientierend bestimmten Halbwertszeit, in Gruppe II liegt sie bei ca. 24 h.

Betrachtet man die in Gruppe I nach 7 Tagen und die in Gruppe II nach 5 Tagen gemessenen HÄS-Werte, so wird eine langsamere Elimination in der ersten Gruppe ersichtlich. Ursache ist der zwar relativ gleiche, aber absolut vermehrte Anteil schwer hydrolysierbarer HÄS in der größeren Infusionsmenge. Der Vergleich mit Untersuchungen, in denen 60 g HÄS pro Person verabreicht wurden (19), unterstreicht dieses. Die HÄS-Spiegel waren dann prozentual nach 7 Tagen noch höher, wie hier in Gruppe I, während umgekehrt bei Zufuhr von nur 30 g HÄS pro Person nach 5 Tagen tendenziell eine ähnliche HÄS-Menge im Serum nachzuweisen war wie in Gruppe II. Die Resultate des Orcin-Verfahrens belegen ebenfalls, daß für HÄS (450.000 / 0,7) bei mehrfachen Infusionen innerhalb von Tagen eine Akkumulation von nur langsam eliminierbaren Kolloidanteilen erwartet werden muß.

Die Ergebnisse für die niedrigmolekulare HÄS (40.000 / 0,55) in Gruppe III entsprechen der erwartet kurzen Verweildauer im Gefäßsystem. Die Halbwertszeit liegt bei ca. 4 h, nach 7 Tagen ist ein signifikanter HÄS-Spiegel nicht mehr zu erfassen. Eine Akkumulationsgefahr ist in den verwendeten Dosen, auch bei mehrmaligen Gaben in wenigen Tagen, nicht gegeben. Andererseits sind die erwünschten Wirkungen auf die Rheologie und die Volumenstabilisation ebenfalls auf einen kurzen Zeitraum von 4 - 6 h beschränkt (9, 27).

Die Auswertung der Gelchromatographien von HÄS (450.000 / 0,7) vor und nach Infusion zeigt, in welcher Weise sich die Molekulargewichtsverteilung intravasal wandelt. Unter der rasch einsetzenden Wirkung von Serumamylase werden die enzymatisch zugänglichen HÄS-Moleküle zerlegt. Chromatographisch macht sich dies vor allem im großmolekularen Bereich bemerkbar. Der Abbau von mittleren und die Ausscheidung von kleinen Molekülen wird durch "Nachlieferung" von Spaltprodukten hochmolekularer

HÄS ergänzt (sh. Abb. 3.2, 3.3 und Tab. 3.2).
Die anfangs rasch einsetzende HÄS-Hydrolyse verlangsamt sich in kurzer Zeit. Köhler (21) fand 4 h nach Infusion, wenn auch mit einer anderen Methode, eine ähnliche Molekulargewichtsverteilung, wie sie hier nach 1 h festgestellt werden konnte. Nach 1 h in-vitro-Inkubation von HÄS (450.000 / 0,7) und Amylase kann Schuster-Gossler (48) zeigen, daß nur noch langsam neue Spaltprodukte und reduzierende Zucker entstehen. Das heißt: Die Amylase ist nach Bildung eines Enzym-Substrat-Komplex (21 - 24) blockiert, und der HÄS-Abbau geht nur noch zögernd voran.

Nach 7 Tagen schließlich finden sich immer noch HÄS im hoch- und mittelmolekularen Bereich, offensichtlich HÄS, die noch nicht oder nicht mehr weiter enzymatisch hydrolysiert werden konnte. Mishler (37) konzentrierte 7 Wochen nach Infusion den HÄS-Bestand aus dem Serum mehrerer Versuchspersonen, die Gelfiltration hatte ihr Maximum ebenfalls bei mittleren Molekulargewichten.

Aus diesen Ergebnissen ist die Folgerung zu ziehen, daß sich in den HÄS-Lösungen des Substitutionsgrades MS = 0,7 ein Anteil von Molekülen befindet, die für eine renale Ausscheidung zu groß sind, die von Serumamylase nicht gespalten werden können, und die nur zögernd in den Organen des RES zerlegt werden können. So werden bei Ratten HÄS-Halbwertszeiten in den Organen des RES zwischen 30 und 100 Tagen beschrieben (59).

5.3. Vergleich von Experiment und Theorie

Entgegen der ursprünglichen Absicht mittels eines ausreichend großen Substitutionsgrades von MS = 0,7 die Hydrolyse von HÄS (450.000 / 0,7) nur zu hemmen, wurden experimentell HÄS-Anteile nachgewiesen, die weitgehend "enzymresistent" sind.

Dies gab Anlaß zur theoretischen Überlegung, mit welcher Wahrscheinlichkeit α-Amylase überhaupt ein HÄS-Molekül spalten kann, in Abhängigkeit von den Parametern Molekulargewicht und Substitutionsgrad.
Anregungen gaben auch die Arbeiten von Painter (45), der Erwartungswerte für Oligosaccharide nach Säurehydrolyse von Polysacchariden bestimmte.

Die Berechnung hier, ausgeführt anhand eines vereinfachten, idealtypischen HÄS-Molekülaufbaus, machen die Bedeutung der Parameter $\bar{M}w$ und MS transparenter. Als zusätzliche, bisher nicht beachtete Größe, wird die Länge der Hydroxyäthyl-Amylose-Ketten innerhalb des Moleküls herausgearbeitet.

Als Resultat kommt der vorrangige Einfluß des Substitutionsgrades DS bzw. des molaren Substitutionsgrades MS für die Hemmung der α-Amylase zum Ausdruck. Unterhalb eines MS von 0,6 ergeben sich nur verschwindend kleine Erwartungswerte für nicht spaltbare HÄS, und dies auch nur bei niedrigen Molekulargewichten, nahe der Nierenschwelle. Liegt MS aber bei 0,7 oder darüber, wächst die Wahrscheinlichkeit für nicht nierengängige und nicht enzymatisch zerlegbare HÄS (sh. Tab. 4.2.2).

Die Steigerung des mittleren Molekulargewichts $\bar{M}w$ bei konstantem Substitutionsgrad erhöht die theoretische Spaltwahrscheinlichkeit. Die Gegenüberstellung verschiedener klinischer Untersuchungen zeigt aber, daß dies auf die langsame Komponente der Eliminationskinetik keinen Einfluß hat (39). Die Amylasen können die höhere Spaltwahrscheinlichkeit rasch ausnützen , zurück bleiben dann Moleküle mittlerer Größe mit geringeren Chancen, zerlegt zu werden. Die prompte Wirkung der Amylasen in-vivo wie in-vitro wurde zuvor schon diskutiert.

Der theoretisch gefundene Faktor Länge und Anzahl der Hydroxyäthyl-Amylose-Ketten innerhalb des HÄS-Moleküls

ist experimentell noch nicht untersucht worden. Es wäre aber denkbar, durch gezielte Änderung der Anzahl von 1-6-α-glykosidischen Verzweigungen den Abbau der HÄS ebenfalls zu steuern.

Die Überlagerung der chromatographisch bestimmten HÄS-Molekulargewichtsverteilung vor Infusion (Abb. 3.2) mit den Erwartungswerten für nicht spaltbare HÄS (Abb. 4.2.1) würde die Verteilung der primär gegen Amylase "resistenten" Moleküle ergeben. Unterstellt man z.B. eine konstante Kettenlänge von 25 Glucoseeinheiten und ein fixes MS von 0,7, so findet man das Maximum nicht abbaufähiger HÄS bei einem MG von ca. 200.000. Moleküle größer MG 350.000 müßten, theoretisch zu fast 100 %, mindestens eine Spaltstelle haben. Dies steht im Widerspruch zu den Chromatographien nach 168 h (Abb. 3.4), wo noch höhere Molekulargewichte nachgewiesen wurden. Die Abweichung läßt sich dadurch erklären, daß die Spaltwahrscheinlichkeit nicht angibt, welche Größe die Bruchstücke nachher haben, und daß die Kettenlänge ja nicht einheitlich für die Moleküle gilt. Eine genauere Bestimmung der Differenzen bedarf jedoch des Einsatzes von Rechnern.

Der theoretische Ansatz eröffnet also den Weg für Computersimulationen. Es könnte über Variation der drei Parameter ein HÄS-Design möglich werden, das die Vorzüge von HÄS optimiert und den Nachteil einer relativ langen Verweilzeit im Gefäßsystem mindert.

6. Zusammenfassung

Das Orcin-Schwefelsäure-Verfahren, eine Furfurolmethode, wurde hier erstmals zum quantitativen Nachweis von Hydroxyäthylstärke (HÄS) eingesetzt. Mit Hilfe eines Zuckeranalysators erfolgte der Reaktions- und Registrationsvorgang automatisch; dies ermöglichte die HÄS-Bestimmungen mit großer Sensibilität und Präzision. Mit dem Verfahren wurden Serum-Konzentrations-Verläufe hoch- und niedermolekularer HÄS sowie die intravasalen Veränderungen der Molekulargewichtsverteilung von hochmolekularer HÄS untersucht.

Zwei Gruppen von je 10 Personen erhielten hochmolekulare und höhergradig substituierte HÄS ($\bar{M}w$ 450.000/MS 0,7) in unterschiedlichen Mengen infundiert. Aus den Messungen wird ersichtlich, daß ein Teil der HÄS innerhalb der ersten Stunden ausgeschieden wird, während ein anderer Anteil nur zögernd die Blutbahn verläßt. Nach 120 h waren in der Gruppe mit der kleineren Infusionsmenge noch 25,7 % des maximalen Serumspiegels nachzuweisen. In der Vergleichsgruppe waren nach 168 h noch 24,2 % der höheren Anfangskonzentration vorhanden.

Acht Probanden bekamen niedermolekulare und niedersubstituierte HÄS ($\bar{M}w$ 40.000/MS 0,50-0,55) infundiert. Hier waren in den Seren nach 120 h keine signifikanten HÄS-Konzentrationen mehr vorhanden.

Die gelchromatographischen Auftrennungen der HÄS ($\bar{M}w$ 450.000/MS 0,7), 120 h und 168 h nach Infusion, ergaben, daß die in der Blutbahn verbliebene HÄS im wesentlichen aus großen und mittleren Molekülen besteht. Diese waren offensichtlich bis dahin weder einem enzymatischen Abbau zugänglich, noch konnten sie durch Organe der RES eliminiert werden. Es ist also nach Infusion größerer Mengen HÄS ($\bar{M}w$ 450.000/MS 0,7) innerhalb weniger Tage eine Akkumulation von HÄS-Molekülen zu erwarten, die nur langsam das Gefäßsystem verlassen.

Eine abschließende wahrscheinlichkeitstheoretische Betrachtung erklärt, daß zumindest für einen Teil der höhersubstituierten HÄS keine enzymatische Spaltung erwartet werden kann. Die größten Erwartungswerte der gegen Amylase geschützten HÄS reichen von niedrigen bis zu mittleren Molekülgrößen. Eine Modellrechnung zeigt, daß in erster Linie der Substitutionsgrad und erst dann das mittlere Molekulargewicht die Spaltwahrscheinlichkeit beeinflussen. Theoretisch hängt schließlich die enzymatische Hydrolysierbarkeit von HÄS auch vom Verzweigungsgrad des Moleküls ab. Die Vorstellung, die intravasale Verweilzeit von HÄS über eine Änderung ihres Verzweigungsgrades zu steuern, ist neu und noch nicht praktisch untersucht worden.

6. Literatur

1. Ballinger, W.F., Murray, G.F., Morse, E.E.:
Preliminary report on the use of hydroxyethylstarch solution in man.
J. surg. Res. 6, 180 (1966)

2. Banks, W., Greenwood, C.T.:
Starch and its components
Edinburgh University press 1975

3. Banks, W., Greenwood, C.T., Muir, D.D.:
The structure of hydroxyethylstarch.
Br. J. Pharmac. 47, 172 - 178 (1973)

4. Bauer, H., Voelter, W.:
Ionenaustauscher , Chromatographie von Kohlenhydraten
Chromatographia 9, No 9 (1976)

5. Bergmann, H.:
Wirkungen und Nebenwirkungen kolloidhaltiger Infusionslösungen.
Infusionstherapie Bd. 2, 43 - 49 (1979)

6. Bogan, R.K., Gale, G.R., Walton, R.P.:
Fate of C-14-labeled HES in animals.
Toxical appl. Pharmacol. 15, 206 - 211 (1969)

7. Boon, J.C., Jesch, F., Ring, J., Messmer, K.:
Intravascular persistence of hydroxyethylstarch in man.
Americ. surg. Res. 8, 497 (1976)

8. Chan, Y.C.:
O - (2 - hydroxyethyl) - amylose as a substrate of porcine pancreatic α-amylase action:
Structural analysis of O - (2 - hydroxyethyl) malto - oligosaccharides.
Ph.D. thesis Iowa State University, USA 1975

9. Ehrly, A.M., Landgraf, H., Hasse, S.:
Verbesserung der Fließeigenschaft des Blutes nach Infusion von niedermolekularer Hydroxyäthylstärke (Expafusin^{R}) bei gesunden Probanden.
Infusionstherapie 6, 331 - 336 (1979)

10. Feller, W.:
Introduction to Probability Theory and its applications.
Vol. I, II 2. ed., John Wiley New York 1960

11. Farrow, S.P., Hall, M., Ricketts, C.R.:
Changes in the molekular composition of circulating hydroxyethylstarch.
Br. J. Pharmac. 38, 725 - 730 (1970)

12. Fresenius, E.:
Broschüre "Plasmasteril".
Chemisch-Pharmazeutische Industrie KG,
6380 Bad Homburg v.d.H., 1978

13. Gahr, R., Bock, P.R.:
Wirkung von HÄS 450/0,7 und Humanalbumin 5% auf den kolloidosmotischen Druck und hämodyn. Parameter bei hypovol. Patienten nach großen abdominellen Eingriffen.
Infusionstherapie 3, 147 - 152 (1980)

14. Gofferje, A., Kozlik, V.:
Zur Hyperamylasämie nach Infusion von Hydroxyäthylstärke unterschiedlicher Molekulargewichtsverteilungen.
Infusionstherapie und Klin. Ernährung 4, 141 (1977)

15. Harke, H., Thoenies, R., Margraf, J., Momsen, W.:
Der Einfluß verschiedener Plasmaersatzmittel auf Gerinnungssystem und Thrombocytenfunktion während und nach operativen Eingriffen.
Anaesthesist 25, S. 366 - 373 (1976)

16. Harper, H.Ä., Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L.:
Physiologische Chemie
Springer, Heidelberg 1975

17. Hempel, V., Metzger, G., Unseld, H., Schoren, R.:
Der Einfluß der Hydroxyäthylstärkelösung auf Kreislauf und Nierenfunktion bei hypovolämischen Patienten.
Anaesthesist 24, 198 - 201 (1975)

18. Jesch, F., Klövekorn, W.P., Sunder-Plassmann, L, Seifert, J., Messmer, K.:
Hydroxyäthylstärke als Plasmaersatzmittel: Untersuchungen mit isovolämischer Hämodilution.
Anaesthesist 24, 202 (1975)

19. Jesch, F., Hübner, G., Zumtobel, V., Zimmermann, M., Messmer, K.:
Hydroxyäthylstärke (HÄS 450/0,7) in Plasma und Leber, Konzentrationsverlauf und histologische Veränderungen beim Menschen.
Infusionstherapie 6, 112 - 117 (1979)

20. Kilian, J., Spilker, D., Borst, R.:
Wirkung von 6-%iger Hydroxyäthylstärke, 4,5-%igem Dextran 60 und 5-%iger Oxypolygelatine auf Blutvolumen und Kreislauf bei Versuchspersonen.
Anaesthesist 24, 193 (1975)

21. Köhler, H., Kirch, W., Horstmann, H.J.:
Die Bildung hochmolekularer Komplexe aus Serumamylase und kolloidalen Plasmaersatzmitteln.
Anaesthesist 26, 623 - 627 (1977)

22. Köhler, H., Kirch, W., Prellwitz, W., Horstmann, H.J.:
Macroamylasemia after treatment with hydroxyethylstarch.
Europ. J. of Clin. Invest. 7, 205 - 211 (1977)

23. Köhler, H.:
Elimination und Volumenwirkung von Hydroxyäthylstärke 450/0,7.
"Wissenschaftliche Information", Fresenius-Stiftung, Beiheft 2 (1978)

24. Köhler, H., Kirch, W., Pitz, H.:
Volumenzweiteffekt nach einmaliger Infusion von Hydroxyäthylstärke.
Klin. Wochenschrift 56, 977 - 983 (1978)

25. Köhler, H., Kirch, W., Klein, H., Distler, A.:
Die Volumenwirkung von 6-%iger Hydroxyäthylstärke 450/0,7, 10 % Dextran 40 und 3,5 % isozyanatvernetzter Gelatine bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.
Anaesthesist 27, 421 - 426 (1978)

26. Kox, W., Höwekamp, Ch.:
Der Einfluß verschiedener Plasmaersatzmittel auf blutgruppenserologische Untersuchungen.
Infusionstherapie 6, 341 - 344 (1979)

27. Kori-Lindner, C., Hubert, H.:
Klinische Erfahrungen mit einer 6 % Hydroxyäthylstärke-40.000-Lösung - Kreislaufparameter, Verträglichkeit.
Infusionstherapie 5, 93 - 98 (1978)

28. Lehninger, A.L.:
Biochemie
2. Auflage, Verlag Chemie Weinheim 1978

29. Lindblad, G., Falk, J.:
Konzentrationsverlauf von Hydroxyäthylstärke und Dextran im Serum und Lebergewebe von Kaninchen und die histopathologischen Folgen der Speicherung von Hydroxyäthylstärke.
Infusionstherapie 3, 301 - 303 (1976)

30. Lutz, H.:
Plasmaersatzmittel
3. Auflage, Thieme Stuttgart 1980

31. Merkus, H.G. u.a.:
Substituent Distribution in Hydroxyethylstarch.
Die Stärke 29, 406 - 409 (1977)

32. Messmer, K., Jesch, F.:
Volumenersatz und Haemodilution durch Hydroxyäthylstärke.
Infusionstherapie 5, 169 - 177 (1978)

33. Metcalf, W., Papadopoulus, A., Tufaro, R., Barth, A.:
A clinical physiologic study of hydroxyethylstarch.
Surg. Gynecol. Obstet. 131, 255 - 267 (1970)

34. Mishler, J.M., Borberg, H., Emerson, P.M., Gross, R.:
Hydroxyethylstarch an agent for hypovolaemic shock treatment.
I. Serum concentrations in normal volunteers following three consecutive daily infusions
Surgical Research 23, 239 - 245 (1977)

35. Mishler, J.M., Borberg, H., Emerson, P.M., Gross, R.:
Part II: Urinary excretion in normal volunteers following three daily consecutive infusions.
Br. J. clin. Pharmac. 4, 591 - 595 (1977)

36. Mishler, J.M.:
Intravasculäre Verhaltenskinetik von HÄS-Fraktionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht.
1. Schweizer HÄS-Symposium in Zürich vom 26.11.1977

37. Mishler, J.M., Ricketts, C.R., Parkhouse, E.J.:
Posttransfusion survival of hydroxyethylstarch 450/0,7 in man: a long-term study.
J. clin. Pathol. 33, 155 - 159

38. Mishler, J.M. Ricketts, C.R., Parkhouse, E.J.:
Changes in the molecular composition of circulating hydroxyethylstarch following consecutive daily infusions in man.
Br. J. clin. Pharmac. 7, 505 - 509 (1979)

39. Mishler, J.M.:
Clinical pharmacology of hydroxyethylstarches.
Blood Transfusion and Immunohaematology Tome XXII - No. 3. 1980

40. Mishler, J.M., Dürr, H.-K.:
Macroamylasemia induced by Hydroxyethylstarch - Confirmed by Gel Filtration Analysis of Serum and Urin.
American Journal of Clinical Pathologists 74, 387 - 391

41. Mishler, J.M., Parry, E.S., Petrie, A.:
Plasma clearance and renal excretion of erythrocyte cryoprotectant hydroxyethylated amylopectin.
Br. J. Haemat. 40, 231 (1978)

42. Mishler, J.M., Beez, M.:
Die mathematische Beschreibung der intravasalen Ausscheidung von HÄS nach wiederholten Infusionen beim Menschen.
Infusionstherapie Bd. 6, Nr. 2 (1979)

43. Mishler, J.M.:
The hydroxyethylated amylopectins. Model substances comprising an two-variable system for the design of specific-acting volaemic colloids.
Clin. Pharmacokinetics (in press)

44. Oda, A. et al.:
Behavior of Hydroxyethylstarch in Plasma and Urin following Intravenous Infusion to Operative Patients.
Jap. J. Anaesth. 21, 747 - 753 (1972)

45. Painter, T.J.:
Random Depolymerisation of Polysaccharides in which the lower Oligosaccharides are Protected from further scissions.
J. Chem. Soc. London 34, 779 - 783 (1963)

46. Radley, J.A.:
Starch and its Derivates
Chapman & Hall Ltd. London 1963

47. Schmidt, F.A.:
Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander.
Klin. Wschr. 39, 1244 (1961)

48. Schuster-Gossler, K.:
Hydroxyäthylstärke
- Abbauprodukte in vivo
- Abbau und Veränderungen der Molekulargewichtsverteilung durch α-Amylase in vitro.
Diss. Tübingen 1982

49. Solanke, T.F.:
Clinical trial of 6 % HES (a new plasma expander).
J. Med. 2, 783 (1968)

50. Strauss, R.G.:
Review of the Effects of Hydroxyethylstarch on the Blood Coagulation System
Transfusion 21, 299 - 301 (1981)

51. Szejtli, J.:
Säurehydrolyse glycosidischer Bindungen
VEB-Fachbuch, Leipzig 1976

52. Tamada, T. et al.:
Studies on Hydroxyethylstarch as a Plasma expander
Part I: Persistance and Enzym Resistance of HES.
Pharmacometrics 4, 505 - 510 (1970)

53. Tamada, T. et al.:
Part II: Influences of Molecular Weight of HES on
Its Physicochemical and biological properties.
Chem. Pharm. Bull. 19, 286 - 291 (1971)

54. Thompson, W.L. et al.:
Intravascular persistence, tissue storage and
excretion of hydroxyethylstarch.
Surg. Gynecol. 1, 965 - 970 (1970)

55. Thompson, W.L., Bloxham, D.D., Rudnick, M.S.:
New short persistence hydroxyethylstarch (HES-S):
Kinetics and efficacy in dogs and patients.
Intensive Care Med. 3, 206 (1977)

56. Thompson, W.L.:
Pharmakologie von Hydroxyäthylstärke (HÄS).
1. Schweizer HÄS-Symposium 26.11.1977, Zürich

57. Thompson, W.L.:
Betrifft den Beitrag von F. Jesch, G. Hübner,
V. Zumtobel, M. Zimmermann und K. Messmer:
Hydroxyäthylstärke (HÄS 450/0,7) in Plasma und
Leber - Konzentrationsverlauf und histologische
Veränderungen beim Menschen.
Infusionstherapie 6, 112 - 117 (1979)

58. Vinazzer, H., Bergmann, H.:
Zur Beeinflussung postoperativer Änderung der
Blutgerinnung durch Hydroxyäthylstärke.
Anaesthesist 24, 517 - 520 (1975)

59. Wikarczyk, C.:
Zum Verhalten von intravenös verabreichter HÄS im Vergleich zu Dextran.
Diss. Frankfurt 1981

60. Wissenschaftl. Tabellen
Ciba Geigy, Basel 1977

61. Yoshida M. u.a.:
Enzymic Degradation of HES
Part I: Influence of the Distribution of Hydroxyethyl Groups on the Enzymic Degradation of HES.
Die Stärke 25, 373 - 376 (1973)

Dank

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. V.Hempel für die Themenstellung dieser Dissertation und bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. W.Heller für die Überlassung des Arbeitsplatzes im Labor der Chirurgischen Universitätsklinik; sie haben mich mit Rat und Tat unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. H.Bauer, Institut für organische Chemie der Universität Tübingen, für die Anleitung bei den Untersuchungen mit dem von ihm entwickelten Zuckeranalysator, sowie Herrn Dr. rer. nat. Harry Saumweber, vom Max-Planck-Institut Tübingen, der mir die Durchführung der Gelchromatographien ermöglicht hat.

Für die sorgfältige Ausführung der Schreibarbeiten durch Frau Heidi Nicklas und der Graphiken durch Herrn Ulrich Beck bedanke ich mich herzlich.

Lebenslauf

Am 24.05.49 wurde ich, Christoph Ehrensperger, als Sohn der Liselotte Ehrensperger, geb. Haug, und des Lehrers Rudolf Ehrensperger in Spaichingen, Krs. Tuttlingen, geboren.

1956 trat ich in die Volksschule in Böttingen, Krs. Tuttlingen, ein und war von 1957 - 1960 in der Volksschule Dürbheim, Krs. Tuttlingen.
Ab 1960/61 besuchte ich das humanistische Gymnasium des Salvatorianerordens in Lochau/Vorarlberg. 1961 wechselte ich an das naturwissenschaftliche Gymnasium in Spaichingen über, wo ich 1969 das Abitur ablegte.

Ab Oktober 1969 studierte ich Physik an der Universität Tübingen und schloß das Studium im August 1976 mit dem Diplom ab. Meine Diplomarbeit im Wahlfach Informationsverarbeitung behandelt systemtheoretisch ein Modell des visuellen Cortex.

1975 begann ich mein Medizinstudium, ebenfalls in Tübingen. Nach dem praktischen Jahr, abgeleistet vom Oktober 1980 bis September 1981 am Bürgerhospital in Stuttgart, bestand ich am 27.10.1981 das medizinische Staatsexamen. Die Approbation erfolgte am 9.12.1981.

Im Februar/März 1982 arbeitete ich als Assistent in einer Landarztpraxis, danach als Assistenzarzt vorwiegend in der gastroenterologischen Abteilung der Medizinischen Klinik in den Städtischen Krankenanstalten Esslingen. Seit Januar 1984 bin ich ebenfalls als Assistenzarzt in der Anästhesieabteilung des Städtischen Krankenhauses Stuttgart-Bad Cannstatt tätig.